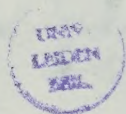


UNTERSUCHUNGEN ZUR
BIOLOGISCHEN AKTIVIERUNG
DES ZYTOSTATIKUMS CYCLOPHOSPHAMID
UND ZU
SPEZIFISCHEN EIGENSCHAFTEN
SEINER METABOLITEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
KLAUS WINCKLER
aus
Berlin

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR
BIOLOGISCHEN AKTIVIERUNG
DES ZYTOSTATIKUMS
CYCLOPHOSPHAMID
UND ZU
SPEZIFISCHEN EIGENSCHAFTEN
SEINER METABOLITEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien-Universität Berlin

vorgelegt von
KLAUS WINCKLER
aus
Berlin

1. Gutachter : Prof.Dr. H.Nau

2. Gutachter : Prof.Dr. W.Laskowski

Tag der mündlichen Prüfung : 16.12.1983

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Material und Methoden</u>	8
II.1.1. Bakterienstämme.....	8
1.2. Aufbewahrung.....	9
II.2.1. Mäusestämme.....	10
2.2. Tierhaltung.....	11
II.3. Puffer und Medien.....	12
II.4. Chemikalien.....	12
II.5. Metabolische Aktivierung.....	16
5.1. S9 - Fraktionen.....	16
5.1.a. Kommerzielle S9 - Fraktionen.....	16
5.1.b. Präparation der S9 - Fraktionen.....	17
5.2. S9 - Mix.....	18
II.6. Mutagenitätstest (Ames on-plate-assay).....	18
II.7. Vorbehandlung der Mäuse.....	19
II.8. Aufarbeitung der Gewebeproben (Extraktion und Derivatisierung).....	19
II.9. Gaschromatograph - Massenspektrometer (GC-MS) Messungen.....	22
II.10 Mathematische Auswertung der Experimente.....	22
III. <u>Resultate</u>	24
III.1. Cyclophosphamid (CPA) und deuterierte Derivate.....	24
1.1. Mutagenität im Ames - Test.....	24
<u>1.2.</u> ⁺ Induktion von Sister-Chromatid-Exchanges (SCEs) und Chromosomenaberrationen.....	27
<u>1.3.</u> Teratologische Daten.....	27
<u>1.4.</u> Pharmakokinetik und transplacenter Übergang.....	30
III.2. Cyclophosphamid (CPA) und Metabolite.....	35
2.1. Mutagenität im Ames - Test.....	35
2.1.a. Einfluß metabolischer Aktivierungssysteme unter Verwendung von S9 - Fraktionen aus unterschiedlich vorinduzierter Rattenleber.....	35

2.1.2.	Einfluß metabolischer Aktivierungssysteme unter Verwendung unterschiedlicher S9 - Fraktionen aus Mäuseleber oder -niere.....	42
2.1.3.	Einfluß eines Monoaminoxidase-Hemmers (MAO-I) auf die Aktivierung von CPA.....	54
2.1.4.	Einfluß einer Monoaminoxidase (MAO) auf die Aktivierung von CPA.....	57
<u>2.2.</u>	Induktion von SCEs.....	66
<u>2.3.</u>	Teratologische Daten.....	68
2.4.	Pharmakokinetik und transplacenter Übergang.....	79
IV.	<u>Diskussion</u>	81
IV.1.	CPA und deuterierte Derivate.....	81
IV.2.	CPA und Metabolite.....	92
2.a.	Aktivierung mit Ratten S9.....	99
2.b.	Aktivierung mit Maus S9.....	112
V.	<u>Zusammenfassung</u>	122
VI.	<u>Literatur</u>	126

⁺ Kapitel, deren Kennziffern unterschrieben sind, wurden ganz (—) bzw. teilweise (---) von beteiligten Arbeitsgruppen des Projekts bearbeitet (s. a. Einleitung).

I. EINLEITUNG

=====

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei Ziele:

1. Sie soll einen Beitrag liefern zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus und der Wirkungsspezifität von Cyclophosphamid (CPA) in unterschiedlichen Geweben.
2. Sie soll Aufschluß geben, ob durch kombinierten Einsatz von unkomplizierten und Routine-Testverfahren mit verhältnismäßig geringem zeitlichen und materiellen Aufwand aussagekräftige und verlässliche Resultate zu 1. zu erhalten sind.

Cyclophosphamid (Abb. 1) ist ein 1958 in den Asta-Werken, Bielefeld entwickeltes Chemotherapeutikum und Immunsuppressivum, das in der Krebstherapie weitverbreitet eingesetzt wird. Es gehört zu den bis heute bestuntersuchtesten Krebstherapeutika. Die Entwicklung dieser Substanz geschah unter dem Gesichtspunkt, eine möglichst hohe Anti-Tumorzellspezifität und damit ein geringes Therapierisiko (Verhältnis: therapeutische Wirkung/unerwünschte Nebenwirkungen) zu erreichen. Die Forschungen über CPA trugen sehr viel zum Verständnis von Mechanismen der Tumorentstehung und -entwicklung bei (Brock, 1976; Grochow et al., 1979; Hohorst et al., 1976; Wagner et al., 1980).

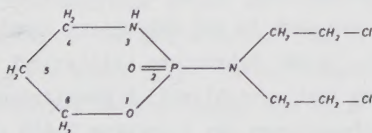
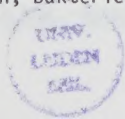


Abb. 1 Cyclophosphamid (CPA); MW: 261 g/mol

Hinweis: Wegen bestehender Definitionsunterschiede für die Begriffe in vivo/ in vitro wird darauf hingewiesen, daß in der vorliegenden Arbeit in vivo: Experimente im lebenden Tier; in vitro: Experimente außerhalb des lebenden Gesamtorganismus (Tier) "im Reagenzglas" (z.B. auch Zellkulturen, Bakterientests) bezeichnet.



CPA ist ein Phosphoramid Mustard Derivat. Es ist ein indirekt wirkendes Agens, d.h., seine Wirkungseigenschaften entwickeln sich erst durch metabolische Aktivierung, (Fenselau, 1976). Unmetabolisiertes CPA zeigt weder anti-Tumor- noch Zelltransformationseigenschaften und nur äußerst geringfügige cytotoxische, mutagene und teratogene Aktivitäten (Benedikt et al., 1977; Mohn et al., 1978; Nau et al., 1982). Diese indirekte Wirkungsweise hat sehr wahrscheinlich den Vorteil, daß die Substanz während des Transports weitgehend in ihrer inaktiven Form vorliegt. Es wird angenommen, daß dieser Umstand eine Ursache für die höhere Gewebespezifität und geringeren Nebenwirkungen von CPA, verglichen mit anderen direkt wirkenden Cancerotherapeutika, ist.

Ein generelles Metabolisierungsschema zeigt Abb. 2. Hier zusammengestellt und im folgenden beschrieben sind nur die zentralen Metaboliten und Wege. Weiter differenzierte Metabolismusschemen sind u.a. in den folgenden Arbeiten zu finden: Brock, 1976; Hohorst et al., 1976; Struck et al., 1971; Struck et al., 1975.

Der erste metabolische Schritt in der Aktivierung von CPA ist die Hydroxilierung am C₄ des Oxazaphosphorinringes. Diese Reaktion wird durch ein Cytochrom P-450, ein zum Cytochrom-b-Komplex gehörendes Hämoprotein mit der Funktion einer mischfunktionellen Oxidase katalysiert. Dieses Enzym ist im glatten endoplasmatischen Retikulum hauptsächlich von Leber- und Nebennierenrindenzellen lokalisiert. Nachweisbar ist es allerdings auch in fast allen anderen Körperzellen. Dort wie auch in der Nebenniere nimmt es aber kaum am Pharmakometabolismus teil. In der Nebenniere katalysiert es nach der bisher verbreiteten Auffassung fast ausschließlich Reaktionen im Steroidhormonstoffwechsel. Die Hauptfunktionen des Cytochrom P-450 in der Leber sind die einer O- oder N-Demethylase oder allgemeiner -Dealkylase sowie einer Hydroxylase. Das Enzym dient in der Leber hauptsächlich der Aktivierung - Deaktivierung (Conney, 1967; Netter, 1980). Cytochrom P-450 läßt sich auch in anderen Geweben und auch in Einzellern nachweisen. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist es ebenfalls vertreten; Struktur und Funktion scheinen sich von den Cytochromen P-450 aus Gewebezellen kaum zu unterscheiden, die Funktion in der Hefe ist aber noch unbekannt. Die Produktion des Enzyms ist Wachstumsphasen- und C-Quellen-abhängig (Callen et al., 1977).

Dieser Organismus ist daher wie auch *E. coli* K-12 und periphere Lymphozyten in der Lage, CPA in geringem Umfange zu mutagenen Abbauprodukten zu metabolisieren (Callen et al., 1977; Gatehouse, 1978; Waalkens et al., 1981).

Der aus dieser Reaktion entstehende erste Metabolit 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (4-OH-CPA) steht im tautomeren Gleichgewicht mit dem ringoffenen Aldophosphamid (Aldo-PA). Beide Substanzen zeigen keine signifikante anti-Tumor-Aktivität. Sie stellen, wie allgemein angenommen wird, die Transportform von CPA dar und spielen somit im Stoffwechsel von CPA eine zentrale und äußerst wichtige Rolle (Domeyer et al., 1980; Hohorst et al., 1976).

Der weitere Abbau von CPA spaltet anschließend in mehrere Wege auf. Enzymatisch wird 4-OH-CPA zu dem mutagen-, teratogen- und cytotoxisch relativ inaktiven 4-Keto-CPA detoxifiziert. 4-Keto-CPA ist neben Carboxyphosphamid (Carboxy-PA) das Hauptausscheidungsprodukt im Urin. Aldo-PA wird enzymatisch in Carboxy-PA überführt, das selbst sehr mutagen, cytotoxisch und auch teratogen wirkt (Ellenberger et al., 1977; Hohorst et al., 1976; Struck et al., 1971). Carboxy-PA geht spontan oder enzymatisch in Hydacrylsäure und Phosphoramid Mustard (PAM) über. Hydacrylsäure ist stark mutagen, über die cytotoxischen und teratogenen Eigenschaften ist demgegenüber wenig bekannt.

Der als Hauptanwärter für die biologische Aktivität von CPA angesehene Metabolit PAM entsteht primär durch die spontane und enzymatische Umsetzung von Aldo-PA in PAM und Acrolein. PAM zeigt unter physiologischen Bedingungen in vitro ein hohes alkylierendes Potential (Colvin et al., 1976) und wurde in zahlreichen Untersuchungen als hoch teratogen, mutagen und cytotoxisch eingestuft (u.a. Hohorst et al., 1976; Nau et al., 1982; Struck et al., 1975). Die Aussagen über Acrolein waren bisher weniger eindeutig, was auf experimentelle Schwierigkeiten mit diesem Metaboliten zurückzuführen ist. Nach neuesten Erkenntnissen trägt Acrolein entgegen früheren Annahmen einen sehr wichtigen Teil zur biologischen Wirkung von CPA bei. Es ist stark cytotoxisch, kaum mutagen und hat eine hohe teratogene Wirksamkeit (Alarcon et al., 1972; Hales, 1982; Lijinsky et al., 1980). Die mutagenen und teratogenen Eigenschaften von CPA sind nach diesen Untersuchungen vermutlich zu trennen, wobei PAM bzw. dessen Abbauprodukte für Mutagenität,

Acrolein für teratogene Eigenschaften verantwortlich ist (Hales, 1982). Bisher wurde Acrolein wegen seiner hohen Reaktivität und Toxizität als einer der Metaboliten angesehen, die für einige der unerwünschten Nebenwirkungen von CPA verantwortlich sind, mit der Teratogenität aber kaum in Verbindung gebracht. Identifiziert wurde es als auslösendes Agens der hämorrhagischen Cystitis der Blase, die bei Behandlung mit CPA auftreten kann (Cox, 1979). Die Besonderheit von Acrolein scheint in der Tatsache zu liegen, daß es seine spezifische Wirkung nur in einem äußerst eng begrenzten Dosisbereich entwickelt (Hales, 1982; Lijinsky et al., 1980).

PAM selbst wird höchstwahrscheinlich teils spontan, teils enzymatisch in Nor-Nitrogen-Mustard (Nor-HN2) umgewandelt. Auch Nor-HN2 ist höchst mutagen und cytotoxisch, es ist aber nicht zweifelsfrei geklärt, ob PAM oder Nor-HN2 unter den im jeweiligen Organismus vorherrschenden physiologischen Bedingungen das stärker alkylierende Agens ist (Colvin et al., 1976). Die Mutagenität von Nor-HN2 ist bei physiologischem pH in in vitro Mutagenitätstests in Bezug auf die Auslösung von Punktmutationen höher, bei der Auslösung von SCE's niedriger als die von PAM. Nach weiteren Resultaten aus Mutagenitätstests zu schließen, könnte auch 2-Chloroethylaziridin, das Abbauprodukt von Nor-HN2, der 'Endmetabolit' für die Mutagenität von CPA sein. Diese Annahme beruht unter anderem auf der Tatsache, daß auch die alkylierenden Reaktionen durch PAM und Nor-HN2 unter physiologischen Bedingungen unter Bildung eines Aziridinium-Zwischenproduktes ablaufen (Fenselau, 1976).

Zur Problematik der Teratogenität von CPA war es notwendig, nicht nur die verantwortlichen Metaboliten zu identifizieren, sondern auch zu klären, ob die Aktivierung maternal erfolgt oder embryonal. Teratologische Tests mit CPA, CPA-Derivaten und Metaboliten sowie Messungen des embryonalen Stoffwechsels führten bisher zu folgenden Resultaten:

- CPA wird fast ausschließlich maternal aktiviert.
- Die sensible Entwicklungsphase zur Auslösung von teratologischen Schäden ist eng begrenzt.
- Auch Embryonen können schon in frühen Entwicklungsstadien aufgrund des Auftretens der entsprechenden Enzyme CPA in geringem Umfang metabolisieren. Dieser Anteil ist aber vernachlässigbar gegenüber dem von der Mutter

auf den Embryo übertragenen.

(Fantel et al., 1979; Hales, 1982; Mirkes et al., 1981; Spielmann et al., 1979, 1981 a, b).

Zu klären bleibt folglich die Art und Dauer der sensiblen Phase sowie der transplacentare Übergang von CPA und seinen Metaboliten.

Trotz der oben beschriebenen Kenntnisse über CPA, dessen Metabolismus und Effekte von CPA-Metaboliten bestehen noch viele Unklarheiten über den Wirkungsmechanismus und die die jeweiligen Teileffekte verursachenden Metaboliten. Diese ungeklärten Fragen resultieren u.a. aus Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit von in vitro Experimenten auf die in vivo anzutreffenden Verhältnisse, Vielfach decken sich selbst Ergebnisse aus in vitro Tests, die unter 'physiologischen Bedingungen' durchgeführt wurden, wenig mit den Beobachtungen in vivo. Der Versuch, durch den breiten Einsatz von sehr unterschiedlichen Testverfahren (biologischer, biochemischer, pharmakologischer und teratologischer Art) und die Kombination der daraus erhaltenen Resultate den Verhältnissen in vivo nahezukommen, wird nicht nur aus Kostengründen schon seit Jahren unternommen. Man ist mit diesem experimentellen Ansatz eher in der Lage, artspezifische Reaktionsweisen zu erkennen und entweder zusätzlich zu erforschen oder bei der Auswertung zu eliminieren als im reinen in vivo Experiment.

Das Ziel ist, die Diskrepanz zwischen den Verhältnissen in vivo und in vitro auf ein Minimum zu reduzieren. Jeder experimentelle Ansatz erfaßt oder simuliert nur einen sehr diskreten Teil aus dem komplexen System 'Organismus'. Da bei jedem Experimenttyp der betrachtete oder simulierte Teil des Gesamtkomplexes sich von denen in anderen Experimenten untersuchten unterscheidet, bietet die Kombination der in vitro Resultate die Möglichkeit, bei weitgehender Eliminierung der durch den experimentellen Ansatz bedingten Verfälschungen, ein sehr umfassendes Bild der Verhältnisse in vivo zu erhalten. Die Einengung auf nur eine Methodik schließt notwendigerweise auch immer die Einengung des Betrachtungshorizontes ein, modifiziert damit Qualität und Quantität der Beobachtung, also letztendlich das Resultat.

Aus den genannten Gründen werden in dieser Arbeit alle zu der behandelten Thematik gewonnenen Daten, die im Rahmen einer sehr gut und erfolgreich funktionierenden interdisziplinären Zusammenarbeit entstanden sind, dargestellt und diskutiert. Dieses Projekt war von Herrn Prof. Dr. H. Nau angeregt worden. Es wurde von mir auf- und ausgebaut sowie koordiniert. Die Durchführung dieses Projektes ist als ein wesentlicher Teil dieser Dissertation anzusehen. Auf diese Weise war es möglich, daß Fragestellungen, die mit den von mir selbst eingesetzten Methoden nicht weiter bearbeitet werden konnten, durch das Projekt anderweitig und zusätzlich untersucht werden konnten; andererseits konnte durch Experimente von meiner Seite zur Klärung offener Fragen aus anderen Projektbereichen ein wichtiger Beitrag geleistet werden. Die im folgenden dargestellten Ergebnisse und ein Teil der Methoden sind direkt aus diesem Projekt erwachsen und bisher noch nicht publiziert (Ausnahme: Deuterium-Isotopeneffekt in Nau et al., 1982). Beteiligt waren die Arbeitsgruppen Prof. Dr. H. Nau (Pharmakologie), Prof. Dr. G. Obe (Mutagenität/Cytologie), Prof. Dr. W. Kocher (Teratologie/Embryologie) und Dr. H. Spielmann (Teratologie).

II. MATERIAL UND METHODEN

Sämtliche im folgenden beschriebenen und aufgeführten Materialien und Methoden wurden von mir verwendet und eingesetzt.

II.1.1. Bakterienstämme

Species: *Salmonella typhimurium*

		<u>LPS</u>		<u>Plasmid</u>
TA 1535	Δ (gal chl bio uvrB)	rfa	his G 46	--
TA 1538	Δ (gal chl bio uvrB)	rfa	his D 3052	--
TA 98	Δ (gal chl bio uvrB)	rfa	his D 3052	pKM 101

LPS: Lipo-Polysaccharid-Surface; gal: Galactosidase;

chl: Nitrat-Reductase; bio: Biotin-Bedürftigkeit.

uvrB, his-Gene, rfa und Plasmid: s. unten

Diese Stämme wurden von Ames et al. (1973 a, b; 1975 a, b) speziell für den Einsatz in hochempfindlichen Mutagenitätstests entwickelt. Durch Einführung der rfa - Mutation wird der Aufbau der Polysaccharidketten in der Bakterienzellwand nach wenigen Gliedern abgebrochen. Damit ergibt sich sowohl eine hohe Durchlässigkeit der Zellwand insbesondere auch für große Moleküle, für die eine vollständig ausgebildete Zellwand eine unüberwindbare Barriere für ein Eindringen in die Zelle darstellen würde, als auch der Fortfall der Infektiosität von *Salmonella*, da auch die aus Polysacchariden bestehenden Antigenstrukturen nicht ausgebildet werden können.

Eine weitere Sensibilisierung der Stämme gegenüber mutagenen Substanzen wird durch Ausschaltung des error - free excision-repair-Prozesses (Δ uvrB) und im Falle des Stammes TA 98 durch die zusätzliche Einführung des Plasmids pKM 101 erreicht. Dieses Plasmid codiert für einen error-prone-repair (Walker, 1977) und enthält als Marker ein Ampicillin-Resistenz-Gen (amp^r) (McCann et al., 1975).

Die Markermutationen im Histidingen lassen eine Differenzierung der getesteten Substanzen nach Mutationstypen (basepair-substitution oder frame-shift) zu.

his G 46: Missense Mutation. Diese Mutation wird durch ein breites Spektrum von Substanzen revertiert, die Basenpaarsubstitutionen verursachen. Frameshift - Mutagene revertieren dieses Gen nicht. Es wird vermutet, daß alle 6 möglichen Basenpaarmutationen mit dieser Mutante erfaßt werden können (Ames et al., 1973 a).

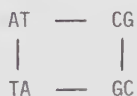
- Es gibt zwei Typen von Basenpaarsubstitutionen:

TRANSITIONEN UND TRANSVERSIONEN

Eine Transition ist der Austausch eines Purins gegen ein anderes Purin bzw. eines Pyrimidins gegen ein anderes. Daraus ergeben sich zwei mögliche Transitionen:



Bei einer Transversion wird ein Purin durch ein Pyrimidin ersetzt oder umgekehrt. Damit ergeben sich 4 Möglichkeiten bei der Transversion:



(nach Graf 1977)

his D 3052: Frameshift Mutation. Dieses Allel enthält eine

-CGCGCG- Sequenz, die durch eine -2 Deletion von -CG- revertiert wird.
-GCGCGC-

Diese Mutante wird u.a. mit und ohne mikrosomales Aktivierungssystem durch sehr viele aromatische Nitrosamine, aromatische Amine, Aflatoxin B 1 und Benzpyren revertiert.

II.1.2. Aufbewahrung

Die Stämme wurden auf Vollmediumplatten bei + 4° C gelagert. Die UV-Sensibilität wurde in regelmäßigen Abständen, die rfa-Mutation sowie der Plasmidgehalt bei jedem Experiment mit einem Spotttest überprüft.

II.2.1. Mäusestämme

Eingesetzt wurden die Stämme CBA / J Kch (CBA) und C57 BL / 6J Kch (Black). Dabei handelt es sich um Abkömmlinge der Inzuchtlinien J bzw. 6J (J : Jackson) die über mehr als 40 Generationen von Herrn Prof. Kocher als sublines gehalten wurden. Die Populationen befanden sich zur Zeit der Versuche nicht mehr in Inzucht, sondern in Zufallspaarung.

Durch morphologische Mandibelmessungen wurde inzwischen nachgewiesen, daß der Streubereich der Meßwerte bei den verwendeten Stämmen mit dem der ursprünglichen Inzuchtstämme noch identisch ist. Dieser Index ist für jeden Inzuchtstamm charakteristisch. Der Test wurde von Herrn Dr. Hedrich am Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover) durchgeführt.

Das Alter der Weibchen zum Zeitpunkt der Paarung lag zwischen 4 - 10 Monaten. Das Erscheinen des Vaginalpfropfes wurde als Tag 0 der Schwangerschaft gewertet. (Daten s. Tab. I)

Für die Messungen des transplacentaren Überganges und der Pharmakokinetik mit Dosen von 120 mg CPA/kg KG wurden Mäuse des Stammes NMRI eingesetzt.

II.2.2. Tierhaltung

4 Tiere /Käfig (Polystyrolbox ca. 25x20x35cm (BxHxT), Raumtemperatur 20 - 22 ° C (klimatisiert), Tag-/Nachtrhythmus 12 h / 12 h, Wasser und Trockenfutter (Altromin) ad lib.

Tab. 1:

Gewichte (Angaben in g)

CBA

	Körpergewicht		Leber	Nieren	Nieren +	Anzahl der
	n. t.	t.			NNR	Embryonen
min.-max.	23.5-27.0	25.7-38.8	1.4-2.3	0.33-0.46	0.34-0.49	5 - 12
$\bar{x}$	24.9 $\pm$ 1.5	33.5 $\pm$ 3.2	1.9 $\pm$ 0.2	0.38 $\pm$ 0.04	0.4 $\pm$ 0.05	> 8
% d. KG (t)			5.6 %	1.13 %	1.19 %	
n (Tiere)	4	29	49	22	6	19

Black

min.-max.	19.7-27.7	22.5-30.3	1.1-1.7	0.27-0.36	0.27-0.35	1 - 8
$\bar{x}$	24.6 $\pm$ 3.1	26.9 $\pm$ 2.1	1.4 $\pm$ 0.2	0.32 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.03	6
% d. KG (t)			5.3 %	1.2 %	1.2 %	
n (Tiere)	8	24	46	15	5	18

NMRI t. ca. 35 g; n. t. ca. 26 g

Abkürzungen: t. - trächtig
n. t. - nicht trächtig
NNR - Nebennierenrinde

II.3 Puffer und Medien

<u>Puffer</u>	0.9 % NaCl	pH 7.0	eingestellt mit HCl
	0.1 M Na_2HPO_4	ph 7.4	
<u>Vollmedium (VS)</u>	0.8 % Bacto Nutrient Broth (Difco)		
	0.5 % NaCl		
	1.5 % Bacto Agar (Difco)		

Minimal Medium (MS) - 'Vogel - Bonner - Agar' -

2.0 % Glucose	
1.5 % Bacto Agar (Difco)	
0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
2.0 g Citronensäure	
10.0 g K_2HPO_4	
3.5 g $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	per 1000 ml
	Aqua dest.

<u>Top Agar</u>	0.6 % Bacto Agar (Difco)
	0.5 % NaCl

Nach dem Autoklavieren wurde der Top agar auf ca. 45 ° C abgekühlt und je 5 ml der folgenden sterilfiltrierten Lösungen/100 ml Top Agar zugesetzt:

1.0 mM L-Histidin HCl (Merck)
1.0 mM Biotin (Merck)

Medien und Puffer wurden bei 123 ° C 25min autoklaviert.

II.4. Chemikalien (Abb. 3 a, b)

Cyclophosphamid (CPA) Handelsname: Endoxan^R (NSC - 26278)

4-OH-Peroxy-Cyclophosphamid (4-OH-Peroxy-CPA);

4-Keto-Cyclophosphamid (4-Keto-CPA);

Carboxy - Phosphamid (Carboxy-PA);

Phosphoramid - Mustard (PAM);

Nor - Nitrogen - Mustard (Nor-HN2);

Ifosfamid (IP);

(alle Substanzen freundlicherweise von Herrn Prof. N. Brock, Asta-Werke, Bielefeld erhalten).

Deuterierte Derivate von CPA (erhalten von Dr. M. Jarman, Inst. of Cancer Research, Royal Cancer Hospital, Sutton, Surrey England) (Jarman and Taylor 1981).

5'5-d₂-Cyclophosphamid (5'5-d₂-CPA);

4'4-d₂-Cyclophosphamid (4'4-d₂-CPA);

4'4-6'6-d₄-Cyclophosphamid (4'4-6'6-d₄-CPA).

Pentafluoropropionsäure (PFPA); N-methyl-N-trimethylsilylfluoroacetamid (MSTFA) (beide von Pierce, Günter Karl OHG, Geisenheim)

Propylglutarsäure (PGA)

Monoaminoxidase (MAO) (Sigma Chemie, München);

Tranylcypromin (MAO-I)(Sigma Chemie, München);

2-Aminoanthracene (2-AA) (EGA Chemie, Steinheim);

Benzo(a)pyren (EGA Chemie, Steinheim);

Acrolein p.A. (Merck, Darmstadt);

NADP - Dinatriumsalz (Boehringer, Mannheim)(Lot: 1151417; 1501320);

Glucose-6-Phosphat (Merck, Darmstadt);

Na-Desoxycholat (Fluka AG, Neu-Ulm);

Kristallviolett (Merck, Darmstadt);

Ampicillin (Binotal^R, Bayer AG);

DMSO p.A. (Merck, Darmstadt); Äthanol abs. (Merck, Darmstadt);

Äthylacetat 'Nanograde' (Promochem, Wesel); Benzol (Merck);

Isopropanol (Merck, Darmstadt)

Sämtliche Chemikalien wurden in fest verschlossenen Gefäßen bei 4 °C dunkel aufbewahrt. Alle Lösungen wurden stets kurz vor Gebrauch in den erforderlichen Konzentrationen hergestellt. Für CPA und seine deuterierten Derivate ergaben sich allerdings bei Lagerung der Lösungen bei 4 °C im Dunkeln bis zu max. 4 Wochen keine deutlichen Änderungen der mutagenen Aktivität im Test.

CPA und sämtliche Metabolite und Derivate wurden in 0.1 M Na₂HPO₄ Puffer pH 7.4 gelöst. Bis auf 4-Keto-CPA und Carboxy-PA waren alle Substanzen sehr leicht löslich.

2-AA und Benzo(a)pyren wurden in DMSO gelöst; diese beiden Substanzen dienten als positive Referenzmutagene.

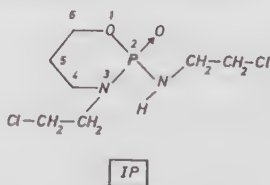
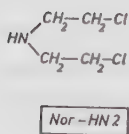
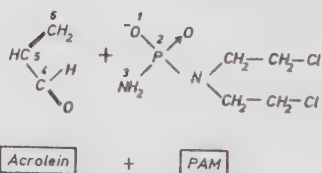
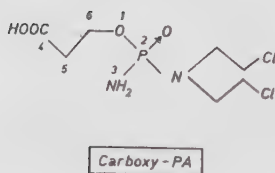
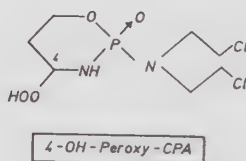
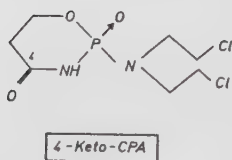
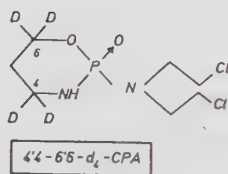
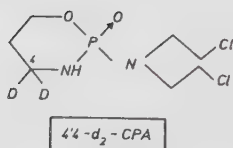
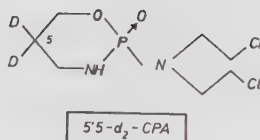
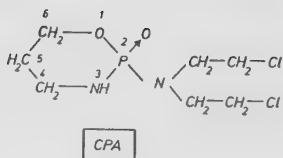


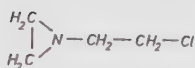
Abb. 3 a: Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit erwähnten und verwendeten Substanzen



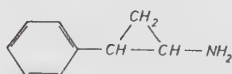
2-AA



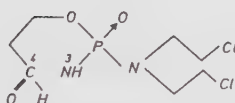
Benzo(a)pyrene



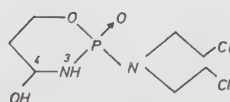
N-2-Chloroethylaziridine



Tranylcypromin



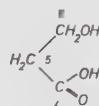
Aldo-PA



4-Hydroxy-CPA



Phosphoric acid mono-amide



Hydacrylic acid

Abb. 3 b: Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit erwähnten und verwendeten Substanzen

Kristallviolett wurde in Äthanol abs., Na-Desoxycholat und Ampicillin in Aqua bidest. gelöst. Diese Substanzen wurden im Spottest verwendet. Die Lösungen wurden auf sterile Filterpapierplättchen (Whatman antibiotic paper disc ϕ 6 mm) aufgetropft, getrocknet und bei 4 °C im Exsiccator gelagert.

Kristallviolett	10 ug/Filter	Prüfung der rfa - Mutation
Na-Desoxycholat	2 mg/Filter	Prüfung der rfa - Mutation
Ampicillin	10 ug/Filter	Prüfung des Plasmidgehalts

Kristallviolett und Na-Desoxycholat sind große, cytotoxische Moleküle, die nur dann in die Zelle eindringen können und diese abtöten, wenn der normale Lipo-Polysaccharid-Surface infolge der rfa-Mutation nicht vollständig ausgebildet wird.

Ampicillin (α -Aminobenzyl-Penicillin) blockiert den Aufbau der bakteriellen Zellwand. Enthalten die Zellen das Plasmid pKM 101, das u.a. das Resistenzgen amp^r trägt, wird eine Abtötung durch Ampicillin verhindert.

Beim Spottest werden die präparierten Plättchen auf die in hoher Konzentration auf VS in Top Agar ausplattierten Bakterien aufgelegt und nach 2 Tagen Bebrütung Ausbildung und Größe eines Hemmhofs um die Plättchen bestimmt.

II.5. Metabolische Aktivierung

II.5.1. S9 - Fraktionen

Diese Fraktionen sind der Überstand (S: Supernatant) eines bei 9000 g 10 min zentrifugierten Gewebehomogenats (meist Lebergewebe). Sie enthalten sämtliche freien Enzyme sowie kleine Zellorganelle wie Mikrosomen. Größere Zellbestandteile wie Zellwandreste, Kerne usw., die kaum metabolische Aktivität besitzen, werden im Pellet verworfen. Zahlreiche Tests haben die nur geringe metabolisierende Aktivität der Pellets bestätigt.

II.5.1.a. Kommerzielle S9 - Fraktionen

Diese Fraktionen wurden produziert von Litton Bionetics Inc. und bezogen über Fresenius (Homburg). Folgende Homogenate wurden verwendet:

Art: Rattenleber

Stamm: Wistar (männlich)

Induktion

aroclor 1254
Phenobarbital
non induced

Chargennummer

EB 187; REE 041
CH 145

Als Induktion wird hier die Vorbehandlung der Tiere mit speziellen Agentien verstanden. Diese Agentien werden einige Zeit (2 Tage bis einige Stunden) vor Entnahme der Lebern dem Futter beigemischt oder injiziert. Sie bewirken (induzieren) einen Konzentrationsanstieg spezieller Enzyme oder Enzymsysteme in der Leber.

Soweit bekannt, werden speziell die folgenden Systeme induziert:

aroclor 1254: cytochrome P-450-linked mixed-function-oxydases
cytochrome P-448-linked mixed-function-oxydases

Durch polychlorierte Biphenyle (PCB's) werden allgemein sowohl die durch Phenobarbital als auch die durch Methylcholanthren induzierbaren Systeme aktiviert.

Aroclor 1254 ist ein PCB mit 54 % Chloranteil, das sehr gute Induktionseigenschaften zeigt.

Phenobarbital: cytochrome P-450-linked mixed-function-oxydases

Aufgeführt sind hier nur die für die Aktivierung/Deaktivierung von CPA wichtigsten Enzymsysteme. Weitere Einzelheiten sind in der folgenden Literatur zu finden (Netter, 1980; Alvares et al., 1977; Conney, 1967; Parkinson et al., 1980; Ryan et al., 1977; Snyder et al., 1979).

II.5.1.b. Präparation der S9 - Fraktionen

Tiere: Mäuseweibchen der Stämme CBA und Black am 11. Tag der Schwangerschaft.

Entnommen wurden neben Lebern und Nieren zur S9-Herstellung Placenten, Embryonen, Amnionflüssigkeit sowie Blut zur Bestimmung der Konzentrationen von CPA und PAM. Die Proben für die Messungen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Die Aufarbeitung der S9-Fraktionen wird anschließend exemplarisch für die Lebern beschrieben. Alle anderen Gewebe werden entsprechend verarbeitet.

Die Tiere wurden gewogen, dekapitiert und die Lebern entnommen. Sofort anschließend werden die pro Stamm auf Eis gepoolten Lebern entweder bei -80°C eingefroren bis zur Weiterverarbeitung oder aufgearbeitet. Zwischen beiden Verfahren ergaben sich keine Aktivitätsunterschiede, die außerhalb des normalen Rahmens lagen.

Die Lebern werden mit 3Volumen eiskaltem $0.1\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.4 (w/v) versetzt und homogenisiert. Das Homogenat wird bei 4°C bei 9000 g 10min zentrifugiert (Beckman J 2-21). Der Überstand (S9 - Fraktion) wird auf Eis gesammelt und anschließend unter der Sterilbank sterilfiltriert (Millipore SM 50 Membranfilter in Reihenfolge $8\mu\text{m}$ - $3\mu\text{m}$ - $1.2\mu\text{m}$ - $0.45\mu\text{m}$). Die sterile S9 - Fraktion wird aufgeteilt in 2 ml Portionen bei -80°C oder -20°C eingefroren und gelagert.

II.5.2. S9 - Mix (nach Ames et al. 1973 b)

Die mixed-function-oxydasen der Lebermikrosomen benötigen für ihre Funktion O_2 und NADPH_2 oder ein NADPH_2 -erzeugendes System. Allgemein wird der folgende standardisierte Mix verwendet, der alle notwendigen Ionen und Cofaktoren enthält. Dieser S9 - Mix wurde in den angegebenen Konzentrationen in allen 'Ames-Test'-Experimenten mit metabolischer Aktivierung (on-plate-assay) eingesetzt.

<u>S9 - Mix</u>	0.1 ml	S9 - Fraktion	/ml
	33 mmol	KCL	
	5 mmol	Glucose-6-Phosphat	
	4 mmol	NADP	
	8 mmol	MgCl_2	
	0.9 ml	$0.1\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.4	/ml

II.6. Mutagenitätstests (on-plate-assay)

Die Bakterien wurden in VS im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln in Übernachtskulturen angezogen. Der Titer lag bei $1-3 \times 10^8$ Z/0.1 ml. Substanzen und S9 - Mix wurden direkt vor dem Experiment gelöst, angesetzt und gemischt. Der S9 - Mix wurde während des Versuchs in Eis gehalten. Geeignete Verdünnungen der Bakterien wurden auf VS als Titerkontrolle ausplattiert.

Für den Test wurden in folgender Reihenfolge die Lösungen in Reagenzgläser pipettiert, die in einem auf 45° C temperierten Heizblock standen:

- 2.5 ml flüssiger Top Agar mit Cofaktoren
- 0.1 ml Testerbakterien
- 0.1 ml Testsubstanz o. Puffer (Spontankontrolle)
- 0.5 ml S9 - Mix (mit metab. Aktivierung)
o. Puffer (ohne metab. Aktivierung)

Dieser Ansatz wurde sofort auf dem Whirl-Mix gemischt und auf MS-Platten gegossen.

Ein Ansatz ohne Testsubstanz wurde auf eine VS-Platte gegeben. Nach Aushärtung des Top Agar (ca. 30min) wurden die o.a. Resistenzplättchen auf die VS-Platte gelegt und VS- sowie MS-Platten für 48 h bei 37° C bebrütet.

Bebrütungszeiten unter 48 h brachten stark schwankende Resultate, mehr als 48 h Bebrütung dagegen kaum noch eine Veränderung der Ergebnisse.

Die Auszählung der his⁺-Revertanten erfolgte manuell.

II.7. Vorbehandlung der Mäuse

Wenn erforderlich, wurden die Tiere subcutan mit 120 mg oder 20 mg CPA/kg KG gespritzt. Die Blut- und Organentnahme erfolgte 10min, 30min oder 60min nach der Injektion. Die Injektionslösung wurde vor jedem Experiment in sterilem Aqua bidest. frisch angesetzt.

II.8. Aufarbeitung der Gewebeproben (Extraktion und Derivatisierung)

Die Methode wurde von der AG Nau speziell von Herrn Prof. H. Nau und Herrn W. Wittfoth entwickelt und in der für meine Zwecke leicht modifizierten - hier angegebenen - Form von mir eingesetzt.

Geräte Homogenisator Viktor Recker 2000 Upm
Tischzentrifuge Eppendorf 5414 12000 Upm

Abkürzungen Xac: Xthylacetat; übrige unter II.4.

Internstandards IP in CHCl₂ für CPA
(IS) PGA in Isopropanol für PAM

- Proben homogenisieren (1:1 (w/v) mit Puffer) in Eppendorf - Reaktionsgefäßen

- zu 200 µl Probe $\left\{ \begin{array}{l} + 100 \mu\text{l } 1.0 \text{ M } \text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ pH} \sim 5.0 \\ + 100 \mu\text{l KCl (gesättigt)} \\ + 1000 \mu\text{l } \text{Äac} \end{array} \right.$

10 min schütteln (Extraktion)

- 2 min 12000 Upm

- 800 µl in Glasröhrchen abpipettieren

- Pellet in 1 ml Äac lösen

10 min schütteln

- 2 min 12000 Upm

- Pellet (PAM)

+ Überschuß NaH_2PO_4

+ 0.5 ml IS für PAM

10 min schütteln

- 2 min 12000 Upm

- 500 µl in Glasröhrchen

eindampfen unter N_2 bei 30°C

- ca 4x mit 0.2 ml Benzol aufnehmen und eindampfen

+ 100 µl MSTFA

30 min bei Zimmertemp.
(derivatisieren)

+ 1 ml IS für CPA

eindampfen unter N_2
bei 30°C

+ eindampfen unter N_2
bei 30°C

+ 100 µl Äac

+ 50 µl PFPA

30 min bei 70°C
(derivatisieren)

eindampfen unter N_2
bei 30°C

+ 100 µl Äac

Messung im GC - MS

(Die Probenröhrchen sind während der Derivatisierung und zur Messung gasdicht verschlossen)

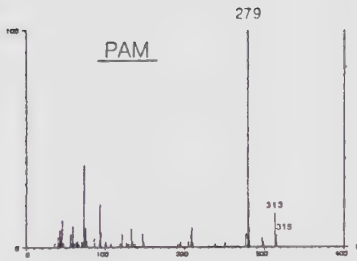


Abb. 4 a: Massenspektrum von PAM

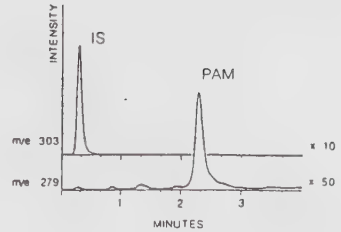


Abb. 4 b: Selected Ion Current (SIC) - Profile von PAM und PGA (IS für PAM)

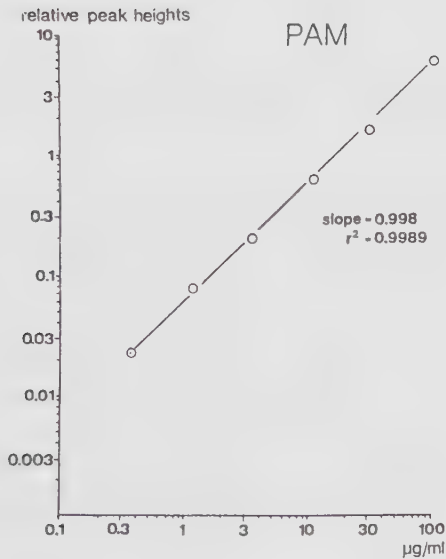


Abb. 4: Eichgerade für PAM erstellt nach der oben beschriebenen Methode (II.8.-9.) von Herrn W. Wittfoth.

Die Nachweisgrenze liegt bei 30 ng PAM/ml, g.

II.9. Gaschromatograph - Massenspektrometer (GC-MS) Messungen

a) Geräte Gaschromatograph: Perkin Elmer F22
Säule: 2 m Länge; Durchmesser innen 2.5 mm, außen 6 mm;
Füllung: 3% OV-17 auf 120-140 mesh Gas Chrom Q
Zwischenstück: Glasfritte Watson - Bieman
Massenspektrometer: MAT CH 7 A (Varian, Bremen)
Computersystem: SS 100 (Varian, Bremen)

b) Meßbedingungen CPA Injektor : 260⁰ C
Detektor : 260⁰ C
Ofen : 220⁰ C isotherm

injizierte Probemenge: 3 ul

PAM Injektor : 260⁰ C
Detektor : 260⁰ C
Ofen : 155⁰ C

injizierte Probemenge: 1 ul

Modus: Selected Ion Monitoring

Die Messungen wurden als Doppelbestimmung/Probe durchgeführt. Der Meßfehler zwischen beiden Messungen war vernachlässigbar.

II.10. Mathematische Auswertung der Experimente

Sämtliche Ergebnisse wurden aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten gewonnen. Bei sehr instabilen Versuchsergebnissen lag die Experimentzahl bei 4-5/Punkt.

Die Resultate sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n_i} \quad ; \quad \sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Zur Bestimmung von Signifikanzen wurde der t - Test angewandt. Es wurde dafür vorausgesetzt, daß das verwendete Datenmaterial ausreißerfrei ist.

Berechnet wird die Zahl TAU. Sie wird mit den in einer Tabelle aufgeführten statistischen t-Faktoren verglichen, die von $f = n_1 + n_2 - 2$ abhängig sind.

$$\text{TAU} = \left| \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d} \right| \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$
$$s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Entscheid

$\text{TAU} < t(95)$: Ein Unterschied zwischen $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ ist nicht feststellbar
($p > 0.05$).

$\text{TAU} \geq t(95)$, jedoch $\text{TAU} < t(99)$: $\bar{x}_1$ unterscheidet sich wahrscheinlich
von $\bar{x}_2$ ($p < 0.05$).

$\text{TAU} \geq t(99)$, jedoch $\text{TAU} < t(99.9)$: $\bar{x}_1$ unterscheidet sich signifikant
von $\bar{x}_2$ ($p < 0.01$).

$\text{TAU} \geq t(99.9)$: $\bar{x}_1$ unterscheidet sich hochsignifikant von $\bar{x}_2$ ($p < 0.001$).

$\bar{x}$: Mittelwert

s : Standardabweichung

n : Anzahl der für den Mittelwert verwendeten Einzelmessungen

f : Freiheitsgrad

p : Irrtumswahrscheinlichkeit

(aus Kaiser, Gottschalk 1972)

III. R E S U L T A T E

Hinweis: Die Zeichnungen in diesem Abschnitt sind für den Gebrauch in Publikationen in Englisch beschriftet.

III.1. CPA und deuterierte Derivate

Zur Aufklärung und Untersuchung der ersten Schritte bei der metabolischen Aktivierung von CPA wurden die mutagenen (in vitro), teratogenen (in vivo) und pharmakokinetischen (in vivo) Eigenschaften von CPA und der deuterierten Derivate 5'5-d₂-CPA, 4'4-d₂-CPA und 4'4'-6'6'-d₄-CPA (Abb. 5) verglichen. Diese Experimente sollten Aufschluß geben, ob ein Isotopeneffekt nachweisbar und dortheraus ein Rückschluß auf den bevorzugten metabolischen Weg zur Aktivierung der Substanz möglich ist.

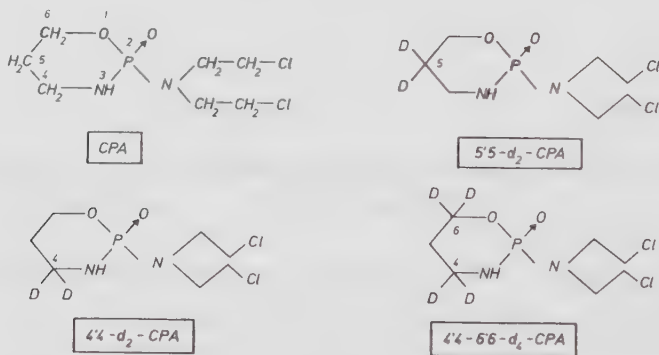


Abb. 5: CPA und deuterierte Derivate

III.1.1. Mutagenität im Ames - Test

Alle getesteten Substanzen sind für den Salmonella Teststamm TA 1535 nach metabolischer Aktivierung in vitro deutlich mutagen. Dieser Stamm erfaßt Mutagene, die Basenpaar-Substitutionen induzieren. Die Dosiseffektbeziehungen sind in Abb. 6 dargestellt.

Ohne metabolische Aktivierung mit S9 - Mix sind die getesteten Substanzen unter den gewählten Bedingungen über den gesamten Dosisbereich nicht mutagen. Es war auch in keinem Fall eine Beeinträchtigung des Wachstums des Hintergrundrasens feststellbar, d.h., die Substanzen sind im getesteten Dosisbereich untoxisch für Salmonella.

Aktiviert ist CPA das stärkste, 5'5-d₂-CPA das schwächste Mutagen (Isotop-effekt 1.7 bei 500 ug/Platte).

Die Unterschiede in der mutagenen Aktivität von 5'5-d₂-CPA zu CPA, 4'4-d₂-CPA und 4'4-6'6-d₄-CPA sind über den gesamten Dosisbereich signifikant. Die Werte von CPA, 4'4-d₂-CPA und 4'4-6'6-d₄-CPA unterscheiden sich statistisch nicht (Tab. 2), obwohl 4'4-d₂-CPA und 4'4-6'6-d₄-CPA reproduzierbar eine etwas geringere Mutagenität als CPA zeigen (Abb. 6).

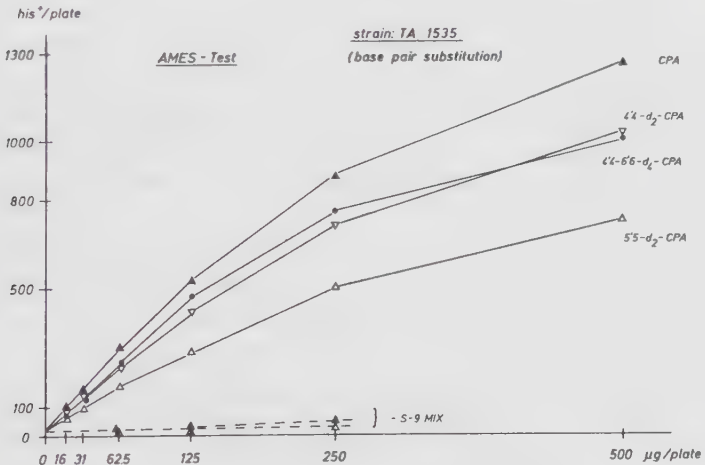


Abb. 6: Mutagenität von CPA und deuterierten Derivaten im Ames - Test. Dosis-effektbeziehungen für den Stamm TA 1535.

Sämtliche Substanzen sind nicht mutagen für den Stamm 98 (Abb. 7). (Die 'positiv'-Kriterien: mind. Verdopplung der Spontanrate und Dosiseffektbeziehung sind nicht erfüllt.) D.h., CPA und die deuterierten Derivate sowie deren durch die Metabolisierung entstandenen Metabolite sind keine frame-shift Mutagene.

Die Werte von CPA, 4'4-d₂-CPA und 5'5-d₂-CPA unterscheiden sich nicht. Die Erhöhung der Werte von 4'4-6'6-d₄-CPA demgegenüber liegt im Signifikanzbereich (Tab. 2). Es fehlt aber ebenfalls eine Dosiseffektbeziehung. Dieser Effekt ist z. Zt. nicht erklärbar.

Gleichartige Experimente mit dem Stamm TA 1538 (TA 98 ohne Plasmid) führten zu entsprechenden Ergebnissen.

Für die Aktivierung wurde in diesen Experimenten S9 - Fraktion aus Lebern aroclor 1254 induzierter Ratten verwendet (Charge REE 041).

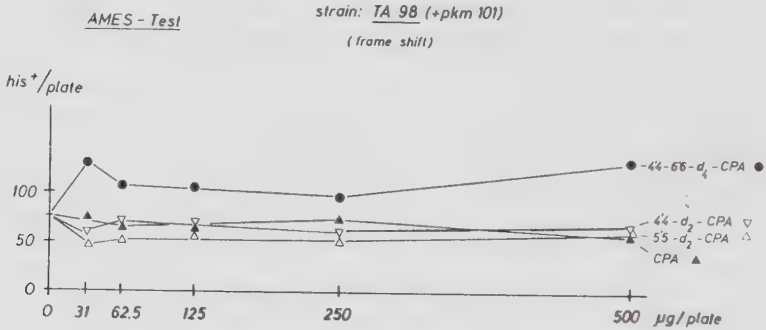


Abb. 7: Mutagenität von CPA und deuterierten Derivaten im Ames - Test.
Dosis-effektbeziehungen für den Stamm TA 98.

DIFFERENCES IN MUTATION INDUCTION						
SIGNIFICANCE (calculated by t - test)						
Strain : TA 1535						
dose µg/plate	CPA 5'-d ₂ -CPA	CPA 4'-d ₂ -CPA	CPA 4'-6'-d ₄ -CPA	5'-d ₂ -CPA 4'-d ₂ -CPA	5'-d ₂ -CPA 4'-6'-d ₄ -CPA	4'-d ₂ -CPA 4'-6'-d ₄ -CPA
500	p < 0.01			p < 0.01	p < 0.05	
250	p < 0.001			p < 0.001	p < 0.001	
125	p < 0.001	p < 0.05		p < 0.01	p < 0.001	
62.5	p < 0.001			p < 0.05	p < 0.01	
31	p < 0.001			p < 0.01	p < 0.05	
16	p < 0.001	p < 0.05	p < 0.05			
Strain : TA 98						
500			p < 0.001		p < 0.01	p < 0.05
250						
125			p < 0.01		p < 0.01	p < 0.05
62.5			p < 0.05		p < 0.05	
31			p < 0.001		p < 0.001	p < 0.01

Tab. 2: Signifikanzen für die in Abb. 6 und 7 dargestellten Dosis-effekt-kurven.

III.1.2. Induktion von Sister-Chromatid-Exchanges (SCEs) und Chromosomen-aberrationen

Geprüft wurden CPA und 5'5-d₂-CPA, die Substanzen mit der höchsten und der geringsten mutagenen Wirksamkeit. Die Methode ist in der Veröffentlichung von Nau et al. (1982) beschrieben. Die Experimente wurden von der AG Prof. Dr. G.Obe (Inst. f. Genetik der FU-Berlin) durchgeführt und die Resultate freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

SCEs

Beide Substanzen induzieren nach metabolischer Aktivierung mit S9 - Mix (Rattenleber Charge REE 041) SCEs in CHO - Zellen. Ohne Aktivierung ergibt sich im getesteten Dosisbereich kein Effekt. Für aktiviertes CPA und 5'5-d₂-CPA treten eindeutige Dosiseffektbeziehungen auf (Abb. 8). Der Isotopeneffekt beträgt wie im Ames - Test 1.7.

Strukturelle Chromosomenaberrationen

Bei zwei unabhängigen Experimenten wurden fast ausschließlich Aberrationen vom Chromatid - Typ gefunden (Chromatid - und Isochromatidbrüche sowie Chromatid - Typ - Austausch). Unter 1000 ausgewerteten Metaphasen traten 10 Aberrationen vom Chromosomentyp auf (9 dizentrische, 1 Ring-Chromosom). Diese wurden von den Resultaten ausgeschlossen.

Isotopeffekte: Brüche 3.3 ; Austausche 12.3.

In den experimentellen Kontrollen gab es keine Erhöhung der Aberrationen gegenüber den 0-Kontrollen (Abb. 8).

III.1.3. Teratologische Daten

Getestet wurden CPA, 5'5-d₂-CPA, 4'4-d₂-CPA und 4'4-6'6-d₄-CPA. Die Methode ist in der Veröffentlichung von Nau et al. (1982) beschrieben. Die Experimente wurden von der AG Dr. H. Spielmann (Inst. für Embryonalpharmakologie, SFB 29 der DFG) durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

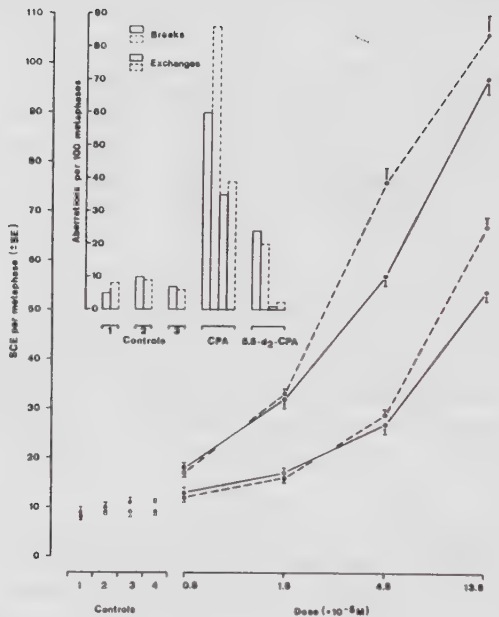


Abb. 8: Induktion von SCEs und strukturellen Chromosomenaberrationen durch CPA bzw. 5'5-d₂-CPA. Geschlossene Symbole und durchgezogene Linien bzw. offene Symbole mit unterbrochenen Linien repräsentieren jeweils die Resultate von zwei unabhängigen Experimenten. CHO-Zellen mit TB-TB Konstitution wurden mit den Mutagenen behandelt und danach für einen Zellzyklus in Medium ohne BuDR wachsen gelassen. Das führte zu Chromosomen mit TT-TB Konstitution.
(aus Nau et al., 1982)

SCEs: Die oberen beiden Kurven zeigen die Dosis-effekt-beziehungen für CPA, die unteren beiden für 5'5-d₂-CPA jeweils in Anwesenheit von S9-Mix. Kontrollen: (1) unbehandelt, (2) S9-Mix, (3) 1.35×10^{-4} M CPA, (4) 1.35×10^{-4} M 5'5-d₂-CPA.

Strukturelle Chromosomenaberrationen: Chromatidbrüche und -austausche für CHO-Zellen behandelt mit 1.35×10^{-4} M CPA bzw. 1.35×10^{-4} M 5'5-d₂-CPA jeweils mit S9-Mix und Kontrollen (1) S9-Mix, (2) 1.35×10^{-4} M CPA, (3) 1.35×10^{-4} M 5'5-d₂-CPA. In jedem Experiment wurden 100 Metaphasen pro Bedingung ausgewertet.

NMRI-Mäusen wurden die Substanzen am Tag 11 der Schwangerschaft s.c. injiziert. Die verwendeten Dosen lagen zwischen 5 - 80 mg/kg KG. Bei allen Dosen wurden die gleichen Typen von Skelettmißbildungen (vornehmlich Oligodactylie, verringerte Länge der Knochen der vorderen Extremität und Palatoschisis) induziert. Die Deuterierung hatte in keinem Fall Einfluß auf Art und Verteilung der Mißbildung. Abnormitäten der inneren Organe wurden nicht beobachtet.

5'5-d₂-CPA war das einzige CPA-Derivat, das einen Isotopeneffekt zeigte (2.5 bei TD 50 (TD : Teratogenitätsdosis)).

Die Dosis-effekt-beziehungen von 4'4-d₂- und 4'4-6'6'-d₄- CPA stimmten mit denen von CPA überein (Abb. 9).

Bei Experimenten, bei denen die Substanzen am Tag 9 oder 10 der Schwangerschaft appliziert wurden, waren die gleichen Effekte wie bei Injektion am Tag 11 zu beobachten.

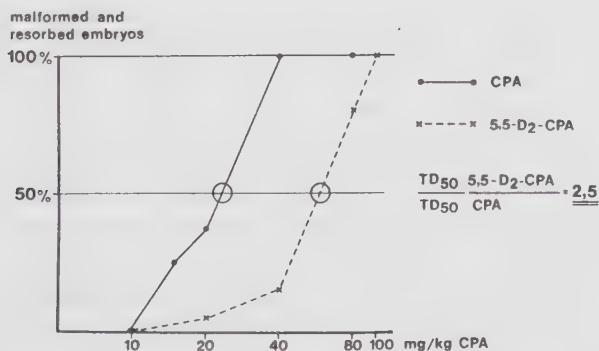


Abb. 9: Teratologische Effekte von CPA und deuterierten Derivaten. Dosis-effekt-beziehungen bei Injektion am Tag 11 der Schwangerschaft. Die Inspektion der Embryonen erfolgte nach Tötung der Muttertiere am Tag 18 der Schwangerschaft. CPA —, 5'5-d₂-CPA ---.
(aus Nau et al., 1982)

III.1.4. Pharmakokinetik und transplacentarer Übergang

Getestet wurden CPA, 5'5-d₂-CPA und 4'4-d₂-CPA. Testtiere waren trächtige NMRI-Mäuse am Tag 11 der Schwangerschaft. Der Tag 11 wurde gewählt, da die teratogenen Effekte von CPA dort am stärksten ausgeprägt sind (Spielmann et al., 1979, 1981 a, b). Die Experimente wurden im Teil Kinetik in der Hauptsache von Frau C. Lo Turco-Mortler (AG Prof. Dr. H. Nau, Inst. f. Toxikologie der FU-Berlin) durchgeführt (s. Dipl.arbeit, 1981).

Injiziert wurden Einzeldosen von 20, 40 oder 80 mg/kg KG. Die Substanzen wurden schnell resorbiert. Sie verteilten sich über maternales Blut, Placenta, Fruchtwasser (in den: Abbildungen als 'amnion' bezeichnet) und Embryonen (Abb. 10 a-b).

In den ersten Minuten nach der Injektion übersteigt die Konzentration der Substanzen im maternalen Blut die der Konzentrationen in Placenta und Embryonen. Etwa 20min nach der Injektion kehrt sich das Verhältnis um.

Die Halbwertszeiten (HWZ) im Blut betrugen bei einer Dosis von 80 mg/kg KG:

	CPA	4'4-d ₂ -CPA	5'5-d ₂ -CPA
<u>nicht trächtig</u>	11'16''	9'31''	10'03''
<u>trächtig</u>	8'15''	7'33''	4'30''

Die kürzere HWZ bei den trächtigen Tieren könnte darauf beruhen, daß ihnen neben den üblichen Eliminationswegen noch das Volumen von Placenta, Fruchtwasser und Embryo zur Verfügung steht. Die HWZ in den übrigen Geweben der trächtigen Tiere lag etwas höher (9-11 min).

Erstaunlicherweise war bei einer Dosis von 80 mg/kg KG die Konzentration von 5'5-d₂-CPA während der ersten Minuten nach der Injektion in allen biologischen Proben höher als die von CPA und 4'4-d₂-CPA. Durch eine schnellere Abnahme der Konzentration von 5'5-d₂-CPA in allen Geweben kehrte sich dieses Verhältnis nach ca. 25min um (Abb. 10 b). Bei Dosen von 40 mg/kg KG traten diese Effekte nicht auf; die Substanzen verhielten sich identisch. Bei 20 mg/kg KG war das Verhalten von allen Substanzen im Blut und Placenta gleich. In Fruchtwasser und Embryo erreichten die Konzentrationen von CPA und 4'4-d₂-CPA zwischen 10 und 20min ein Maximum, um danach rasch abzufallen. Die Konzentration von 5'5-d₂-CPA erreicht dagegen nie die Werte der anderen Substanzen und fällt ohne ein Maximum zu erlangen kontinuierlich ab (Abb. 10 a).

Die eben beschriebenen Ergebnisse sind nicht als absolute Zahlenwerte, sondern als Tendenzen zu betrachten. Da nur ein Testtier/Punkt zur Verfügung stand, sind Ausreißer unter den Einzelergebnissen nicht auszuschließen. Bei der HWZ von 4'30'' für 5'5-d₂-CPA bei trächtigen Tieren dürfte es sich z.B. um einen solchen Fall handeln. Als Tendenz aus den Experimenten von Lo Turco-Mortler bleibt aber festzuhalten, daß sich CPA und 4'4-d₂-CPA identisch in Pharmakokinetik und transplacentarem Übergang verhalten, nur 5'5-d₂-CPA in der oben beschriebenen Weise sich von diesen beiden Substanzen geringfügig unterscheidet.

Abb. 10 a-b: Transplacentare Pharmakokinetik von CPA, 4'4-d₂-CPA und 5'5-d₂-CPA in trächtigen NMRI-Mäusen am Tag 11 der Schwangerschaft. Vergleich der Substanzen in den biologischen Proben (s. Lo Turco Mortler, 1981).

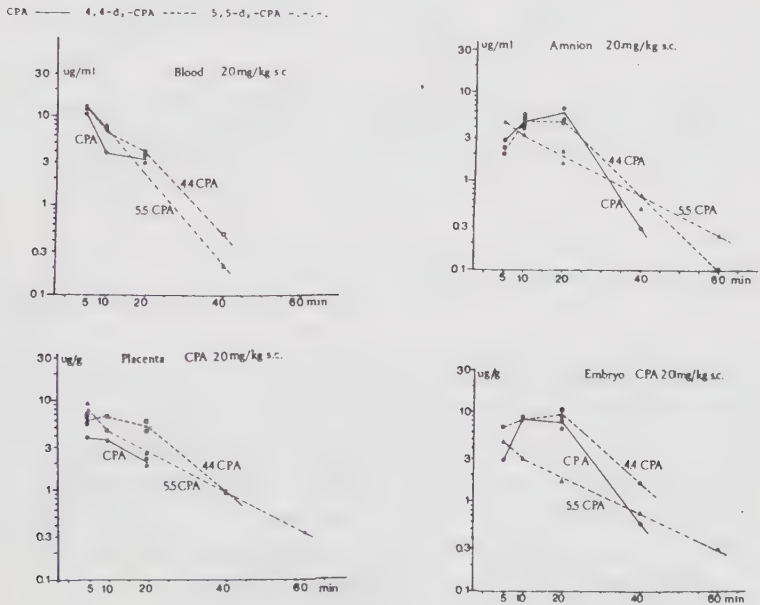


Abb. 10 a: Vergleich für 20 mg Substanz/kg KG

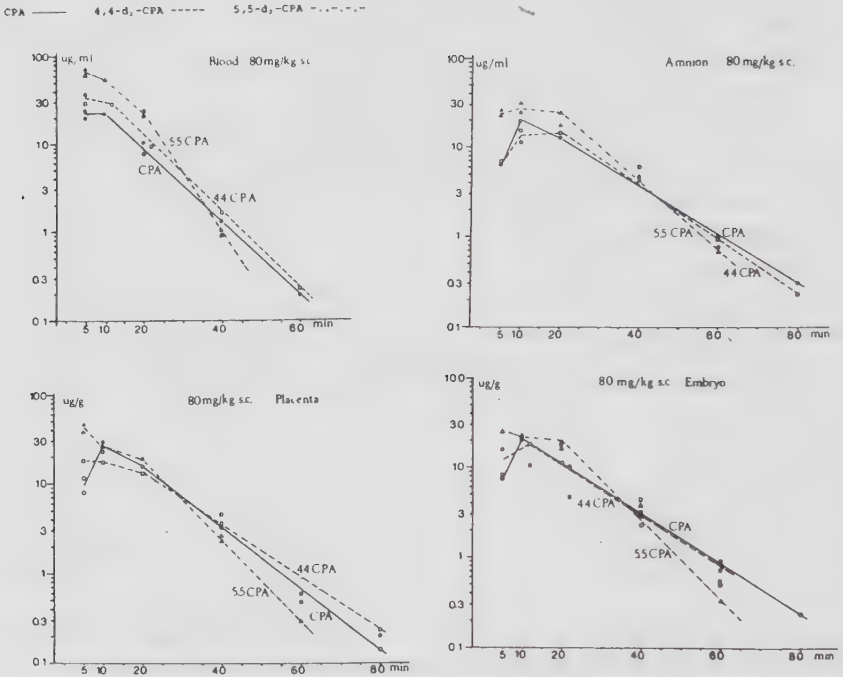


Abb. 10 b: Vergleich für 80 mg Substanz/kg KG

Der transplacentare Übergang wurde von mir aus diesem Grunde an jeweils 5 NMRI Mäusen mit einer Dosis von 120 mg/kg KG für CPA und 5'5-d₂-CPA nochmals exakter bestimmt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte 10min nach der Injektion. Die Injektionslösungen wurden vor dem Experiment gemessen. Danach war die Lösung von 5'5-d₂-CPA entweder 15 % schwächer konzentriert oder die Intensität des Ion 359 war 15 % schwächer als die von CPA. Diese Unterschiede wurden bei der Auswertung ausgeglichen.

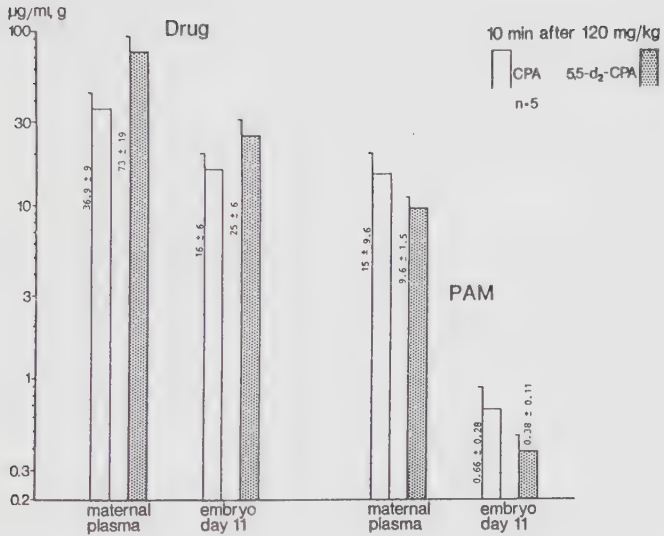


Abb. 11: Konzentrationsverhältnisse von CPA, 5'5-d₂-CPA sowie PAM in maternalem Plasma und Embryo bei der Maus (Stamm: NMRI) 10min nach Injektion der Drogen. Erläuterungen s. Text.

Verteilungen

	<u>CPA</u>	<u>5'5-d₂-CPA</u>
<u>matern. Plasma</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
<u>Embryo</u>	0.43	0.35
	<u>matern. Plasma</u>	<u>Embryo</u>
<u>CPA</u>	<u>0.51</u>	<u>0.64</u>
<u>5'5-d₂-CPA</u>	<u>1</u>	<u>1</u>

Damit sind die o.a. Tendenzen bestätigt. Die Plasma- und Gewebeskonzentration von 5'5-d₂-CPA ist bei dieser Dosis 10 min nach der Injektion allgemein höher als die von CPA (Ursache unbekannt). Der transplacentare Übergang unterscheidet sich zwischen CPA und 5'5-d₂-CPA nicht.

VERTEILUNGEN

(Die Entnahme der Proben zur Messung der Konzentrationen erfolgte 10 min nach Applikation von 120 mg CPA bzw. 5'5-d₂-CPA/kg KG)

	<u>IM EMBRYO</u>		<u>IM MATERNALEN PLASMA</u>
$\frac{\text{CPA}}{\text{PAM}}$	: $\frac{29.8 \pm 13.3}{1}$	;	$\frac{68 \pm 27}{1}$
$\frac{5'5\text{-d}_2\text{-CPA}}{\text{PAM}}$	: $\frac{60 \pm 11.9}{1}$	;	$\frac{21 \pm 4.3}{1}$
$\frac{\text{PAM (CPA)}}{\text{PAM (5'5-d}_2\text{-CPA)}}$	: $\frac{1.74}{1}$		
$\frac{\text{CPA}}{5'5\text{-d}_2\text{-CPA}}$	: $\frac{0.78}{1}$		

ISOTOPEFETTE

$$\frac{\text{PAM (CPA)}}{\text{CPA}} \bigg/ \frac{\text{PAM (5'5-d}_2\text{-CPA)}}{5'5\text{-d}_2\text{-CPA}} = \frac{2.2}{1} \quad (\text{Embryo})$$

D.h., im Embryo ist in vivo die aus CPA gebildete PAM-Menge doppelt so hoch wie die aus 5'5-d₂-CPA entstandene. Der Isotopeffekt beträgt 2.2.

$$\frac{\text{PAM (CPA)}}{\text{CPA}} \bigg/ \frac{\text{PAM (5'5-d}_2\text{-CPA)}}{5'5\text{-d}_2\text{-CPA}} = \frac{3.2}{1} \quad (\text{mat. Plasma})$$

Der Isotopeffekt für die PAM-Formation im maternalen Plasma beträgt 3.2.

Die angegebenen Isotopeffekte sind für identische Gewebskonzentrationen von CPA und 5'5-d₂-CPA berechnet.

III.2. CPA und Metabolite

Die Einzeltestung von CPA und den Hauptmetaboliten in unterschiedlichen Systemen bezweckte, den bzw. die für die Wirkungen und Nebenwirkungen verantwortlichen Metaboliten einzukreisen und zu identifizieren.

Die getesteten Substanzen standen in reiner Form zur Verfügung. Für sämtliche beschriebenen Tests wurden jeweils Substanzen identischer Chargen verwendet.

III.2.1. Mutagenität im Ames - Test

Sämtliche unter diesem Abschnitt beschriebenen Mutagenitätstests wurden nach dem unter II.6. aufgeführten Standardprotokoll für 'on-plate-assay' durchgeführt.

Die Substanzen wurden direkt vor den Tests gewogen und gelöst.

Als Teststamm wurde die base-pair-substitution Mutante *Salmonella typh.* TA 1535 verwendet. Die frame-shift Mutanten TA 1538 und TA 98 wurden nicht eingesetzt, da bis auf Acrolein(s.u.) keine der getesteten Substanzen mit oder ohne metabolische Aktivierung in diesen Stämmen Mutationen induziert.

III.2.1.1. Einfluß metabolischer Aktivierungssysteme unter Verwendung von S9 - Fraktionen aus unterschiedlich vorinduzierter Rattenleber

Getestet wurden CPA, 5'-d₂-CPA, 4-keto-CPA, 4-OH-peroxy-CPA, Carboxy-PA, PAM, Nor-HN2 und Acrolein.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 3 - 8 unabhängigen Experimenten.

Die verwendeten S9 - Fraktionen wurden bezogen von Fa. Fresenius (Bad Homburg)(Hersteller: Litton Bionetics). Sie waren hergestellt nach dem Standardprotokoll (II.5.1.b). Eingesetzt wurden Leberfraktionen von: nicht-, Aroclor 1254- oder Phenobarbital-induzierten männlichen Wistar-Ratten.

Die Dosiseffektbeziehungen für jede der getesteten Substanzen ohne Aktivierung und unter Einfluß der unterschiedlichen S9 - Fraktionen sind in Abb. 12 a - g dargestellt.

Ohne Aktivierung (-S9) sind CPA, 5'5-d₂-CPA im getesteten Dosisbereich nur sehr schwach mutagen. Nach den Testkriterien (Dosis-Effektbeziehung und mindestens Verdopplung der Spontanmutationsrate) liegen beide Substanzen auch bei 500ug/Platte noch unter dem Grenzwert für die Einstufung 'mutagen'.

Auch 4-OH-peroxy-CPA (Abb. 12 c) erscheint ohne Aktivierung (-S9) im Bereich 0-62 ug/Platte als sehr schwach mutagen. Wegen der hohen Cytotoxizität der Substanz (ca. 10 % Überlebende bei 62 ug/Platte) kann über die Mutagenität in diesem Fall keine Aussage getroffen werden. Sehr wahrscheinlich wird eine größere Zahl Mutationen induziert, deren Erfassung durch die toxischen Effekte der Substanz auf die Zellen aber nicht möglich ist. Bei Konzentrationen über 62 ug 4-OH-peroxy-CPA/Platte sind die cytotoxischen Effekte so stark ausgeprägt, daß keine Revertanten mehr nachweisbar sind und auch der Hintergrundrasen stark beeinträchtigt ist (s. auch Hales, 1982).

Bei Einsatz des S9 - Mix ist die nachgewiesene Mutagenität in allen Fällen höher als ohne Aktivierung. Die Ausprägung des Effektes ist bei CPA, 5'5-d₂-CPA und den einzelnen Metaboliten unterschiedlich und abhängig von der jeweiligen Vorinduzierung der Rattenlebern. Bei CPA, 5'5-d₂-CPA und 4-keto-CPA ist der Effekt gering, bei Carboxy-PA, PAM und Nor-HN2 deutlich. Für 4-OH-peroxy-CPA ist ein Entscheid aus o.a. Gründen nicht möglich.

Bis auf Carboxy-PA ergab sich für alle getesteten Substanzen folgende Reihenfolge in der Aktivierungseffektivität der S9 - Fraktionen:
Phenobarbital > Aroclor 1254 > nicht-induziert.

Bei Carboxy-PA (Abb. 12 e) war die Aroclor 1254-induzierte S9 - Fraktion die effektivste vor Phenobarbital und der nicht-induzierten.

4-OH-peroxy-CPA verlor die stark cytotoxische Wirkung durch S9-Aktivierung und entwickelte dafür hochmutagene Eigenschaften (Abb. 12 c).

Bei Lagerung und Lösung bei +4⁰ C im Dunkeln änderten CPA und 5'5-d₂-CPA

ihre Aktivität über 2 Wochen nicht. PAM dagegen zeigte nach 7 Tagen identischer Lagerung bei pH 7.4 die gleichen Mutagenitätswerte im Test wie frisch angesetztes Nor-HN2 (s. Abb. 12 f, g).

Gleichfalls identisch sind die Daten von jeweils frisch angesetzt getestetem Nor-HN2 ohne Aktivierung (-S9) und mit S9 - Mix aktiviertem PAM (Abb. 12 f, g).

Unabhängig von der metabolischen Aktivierung läßt sich für die getesteten Substanzen eine deutliche Reihenfolge - gestaffelt nach ihrer mutagenen Aktivität - aufstellen: Nor-HN2 > PAM > Carboxy-PA $\geq$ 4-OH-peroxy-CPA >> 4-keto-CPA > CPA > 5'5-d₂-CPA (Nicht aktiviertes 4-OH-peroxy-CPA bildet aus den o.a. Gründen eine Ausnahme. Eine Einordnung in das Schema unter dieser Versuchsbedingung ist problematisch.

Abb. 12 a - g: Dosis-Effektkurven (DEK) für CPA, 5'5-d₂-CPA und CPA-Metabolite erstellt ohne metabolitische Aktivierung (-S9) oder mit metabolischer in vitro Aktivierung unter Einsatz von nicht-(non-induced), Aroclor 1254 - oder Phenobarbital-vorinduziertem Leber-S9 männlicher Wistar-Ratten. Einzelheiten und experimentelle Durchführung siehe Text.

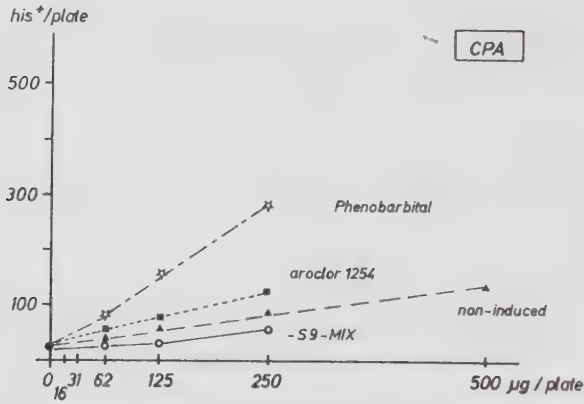


Abb. 12 a: DEK für CPA; metabolische Aktivierung: Rattenleber-S9

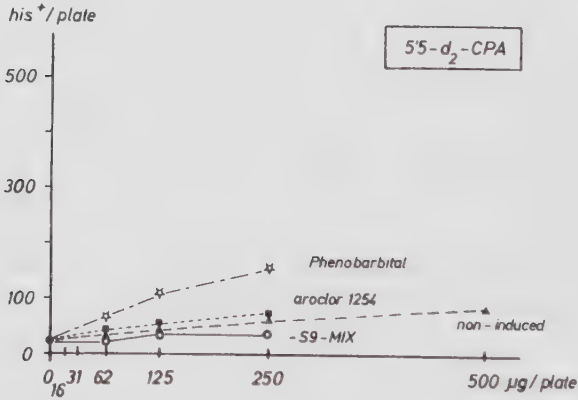


Abb. 12 b: DEK für 5'5-d₂-CPA; metabolische Aktivierung: Rattenleber-S9

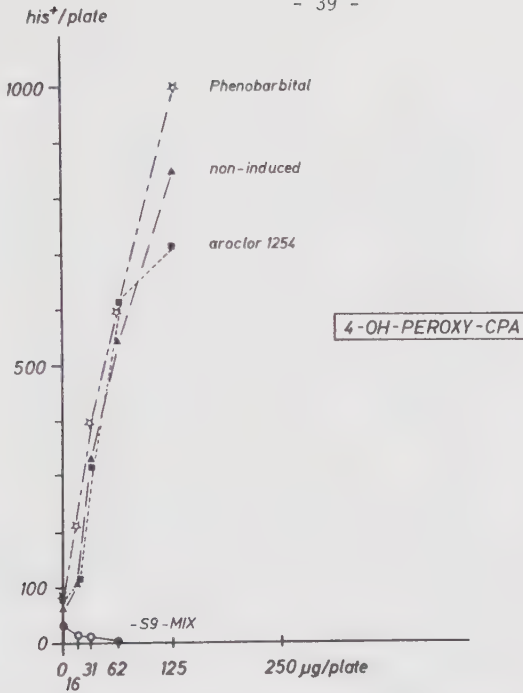


Abb. 12 c: DEK für 4-OH-peroxy-CPA; metabolische Aktivierung: Rattenleber-S9

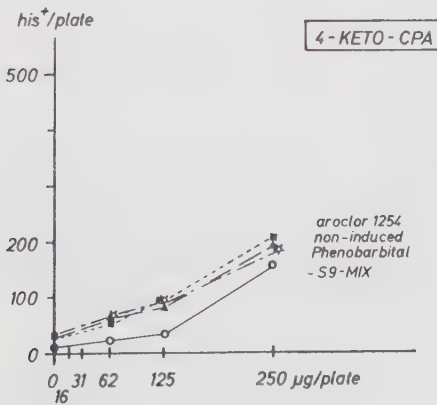


Abb. 12 d: DEK für 4-keto-CPA; metabolische Aktivierung; Rattenlebern-S9

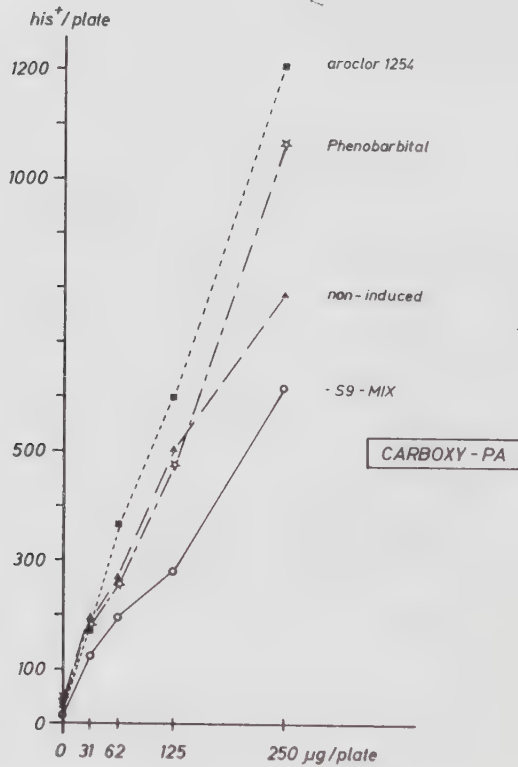


Abb. 12 e: DEK für Carboxy-PA; metabolische Aktivierung: Rattenlebern-S9

Dieser Metabolit ist der einzige in dieser Testreihe, bei dem die aroclor 1254 vorinduzierte Leber-S9-Fraktion eine höhere Aktivierungskapazität besitzt als die Phenobarbital-induzierte

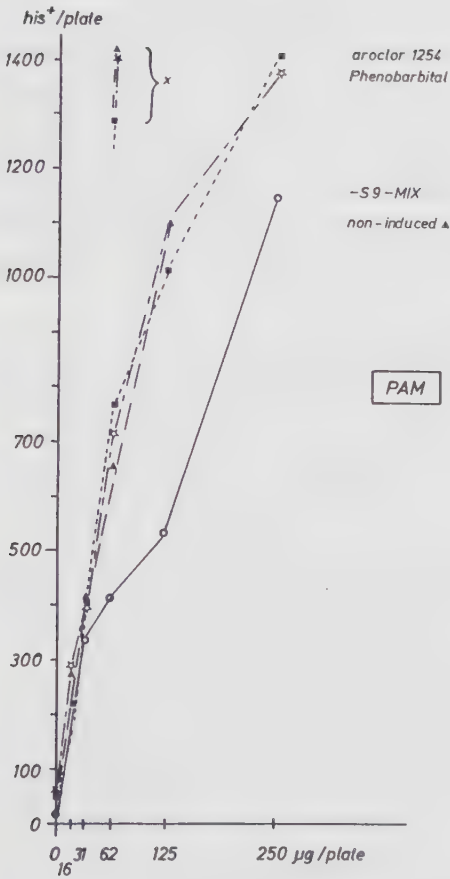


Abb. 12 f: DEK für PAM; metabolische Aktivierung: Rattenleber-S9

x: PAM bei +4⁰ C für 7 Tage vor dem Test in Lösung pH 7.4 gelagert (s. Text)

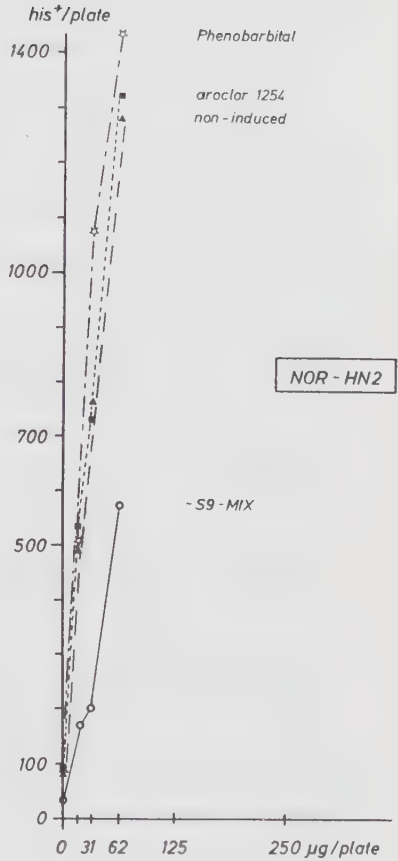


Abb. 12 g: DEK für Nor-HN2; metabolische Aktivierung: Rattenleber-S9

Acrolein wurde in Konzentrationen von 1, 10 ug/Platte am Stamm TA 1535 (base pair substitution) und mit 0.01, 0.1, 1, 10 ug/Platte am Stamm TA 98 (frame shift) getestet. Aufgrund der extremen Cytotoxizität konnte unter den verwendeten Testbedingungen keine Mutagenität nachgewiesen werden. Das Wachstum des Hintergrund-Bakterienrasens war in allen Fällen stark gestört bzw. vollständig inhibiert. Die Toxizität ist mit den bei Hales (1982) beschriebenen Werten identisch (Stämme TA 98, TA 1535: $\leq 1\%$ Überlebende bei 10 ug Acrolein/Platte). Bei Lijinsky et al. (1980) wird ein sehr eng begrenzter Konzentrationsbereich genannt (1 - 4 ug/Platte), in dem Acrolein ohne metabolische Aktivierung für den Stamm TA 98 schwach mutagen ist. Bei Zusatz von S9 - Mix ist auch dort keine mutagene Aktivität feststellbar.

III.2.1.2. Einfluß metabolischer Aktivierungssysteme unter Verwendung unterschiedlicher S9-Fractionen aus Mäuseleber oder -niere

Getestet wurden CPA, 4-OH-peroxy-CPA, 4-keto-CPA, Carboxy-PA, PAM und Nor-HN2. 5'-d₂-CPA konnte mangels Substanz nicht mehr untersucht werden.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus minimal 2 unabhängigen S9-Aufarbeitungen und jeweils 2 - 7 unabhängigen Experimenten je Aufarbeitung.

Die Aufarbeitung der S9 - Fractionen erfolgte wie unter II.5.1.b. beschrieben. Die verwendeten Lebern und Nieren wurden trächtigen Mäusen der Stämme C 57 BL bzw. CBA am Tag 11 der Schwangerschaft entnommen. Es ergaben sich keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität, ob das Gewebe sofort nach Entnahme oder nach bis zu 3-wöchiger Zwischenlagerung bei -80°C aufgearbeitet wurde. Die portionsweise (2 ml) steril abgefüllte S9-Suspension wurde jeweils nach der Aufarbeitung bis zur Verwendung wieder bei -80°C gelagert. Bei dieser Art der Lagerung zeigten sich über den Zeitraum von 6 Monaten keine signifikanten Änderungen in der Aktivierungskapazität. Versuchsweise Lagerung bei -20°C hatte nach 3 Monaten den teilweisen Verlust der höheren metabolischen Aktivierungskapazität der S9-Leberfraktion von CBA zur Folge. Diese Zeitabhängigkeit wurde bei der II. Aufarbeitung (Abb. 13 b) untersucht. Während des ersten Monats nach Aufarbei-

tung betrug die durch Metabolisierung mit C 57 BL-Leber S9 induzierte Mutagenität von CPA über den getesteten Dosisbereich von 62 - 500 ug/Platte durchschnittlich 74 % von der durch CBA-Leber S9 induzierten. Nach 5 Monaten lag dieser Wert bei durchschnittlich 83 % infolge einer reduzierten metabolischen Aktivität von CBA-Leber S9. Die Aktivität von C 57 BL war unverändert.

Bei der Sterilfiltration war auffällig, daß trotz identischer Vorbehandlung etwa gleicher Lebermengen die S9 - Fraktion von CBA erheblich schlechter sterilfiltrierbar war als die von C 57 BL, was auf einen hohen Anteil grob-volumiger Partikel - eine andere Gewebestruktur - bei CBA hinweisen könnte.

Für alle getesteten Substanzen mit Ausnahme von Nor-HN2 hatte die CBA-Leber S9-Fraktion eine gering erhöhte Aktivierungskapazität gegenüber der C 57 BL-Fraktion (Abb. 13 a-g). Allein Nor-HN2 wurde durch die C 57 BL S9-Fraktion bei der höchsten getesteten Konzentration (16 ug/Platte) zu - ebenfalls gering - höherer mutagener Aktivität metabolisiert als durch die CBA-Fraktion ausgeprägt. Er erreicht bei den Dosen von 250, 500 ug/Platte ca. 30 %. Diese Differenz war streng reproduzierbar (Abb. 13 a, b), lag meist aber an bzw. unter der Grenze statistischer Signifikanz. (Als Beispiel die II. Aufarbeitung (Abb. 13 b): Signifikanz nach t-Test: 62, 125 ug/Platte: keine signifikanten Unterschiede, 250 ug/Platte: $p < 0.05$, 500 ug/Platte: $p < 0.001$). Aufgrund der Tatsache, daß bei insgesamt 3 unabhängigen Aufarbeitungen gepoolter Lebern aus jeweils unabhängigen Versuchsserien dieses Resultat qualitativ und quantitativ bestätigt wurde, wird dieser Unterschied in der metabolischen Aktivität als sehr wahrscheinlich gewertet.

Die Reihenfolge in der mutagenen Aktivität der Substanzen entspricht - unabhängig von der Art der Aktivierung durch S9 aus Lebern von CBA oder C 57 BL - bis auf die Reihenfolge von 4-OH-peroxy-CPA und Carboxy-PA der bei Aktivierung mit Rattenleber-S9 erhaltenen:

Nor-HN2 > PAM > 4-OH-peroxy-CPA > Carboxy-PA >> 4-keto-CPA > CPA (Abb. 13a-g).

Abb. 13 a - g: Dosis-Effektkurven (DEK) für CPA und Metabolite unter Verwendung von Leber-S9 schwangerer Mäuse (Tag 11 p.c.) der Stämme CBA und C 57 BL (Black)

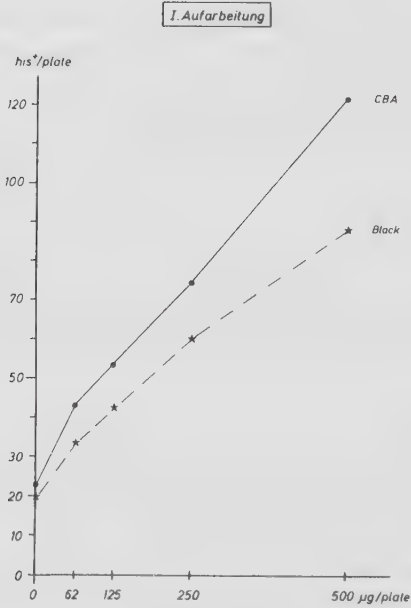


Abb. 13 a: DEK für CPA;
metab. Aktivierung: Leber-
S9 CBA, C 57 BL; I. Aufar-
beitung

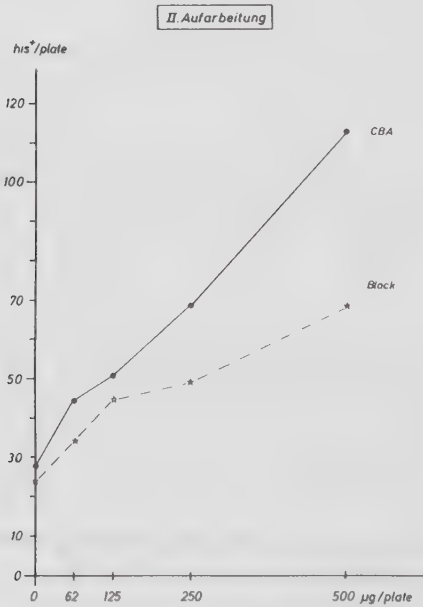


Abb. 13 b: DEK für CPA;
metab. Aktivierung: Leber-
S9 CBA, C 57 BL; II. Aufar-
beitung

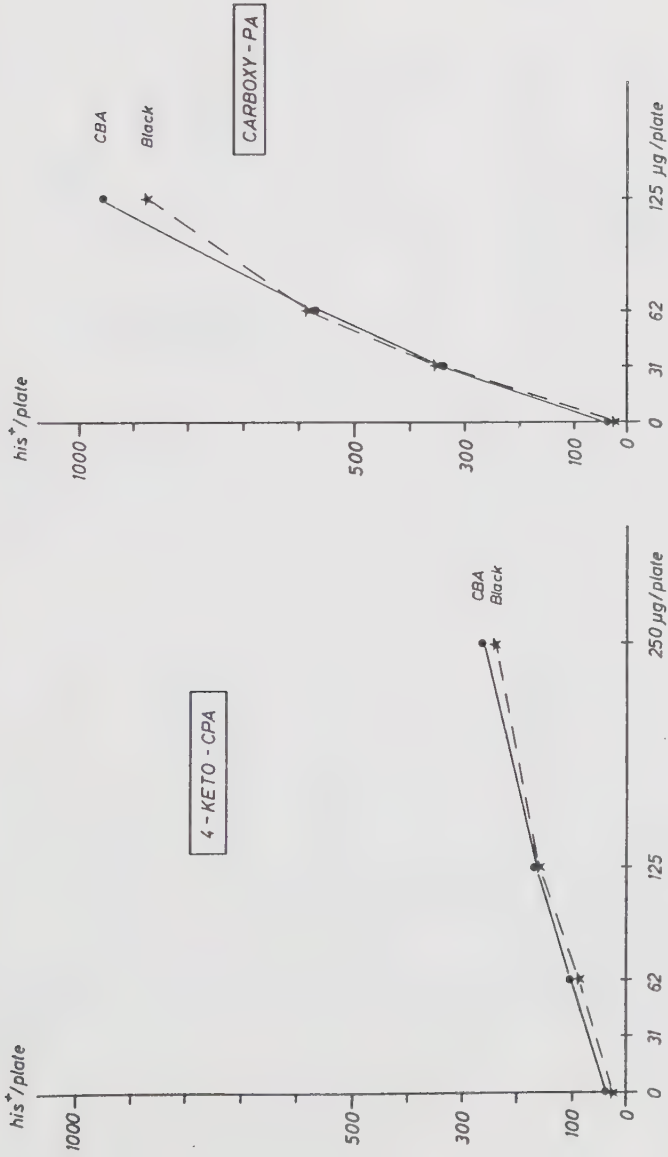


Abb. 13 c: DEK für 4-keto-CPA

Abb. 13 d: DEK für Carboxy-PA

metabolische Aktivierung: Leber-S9 CBA, C 57 BL; I. und II. Aufarbeitung

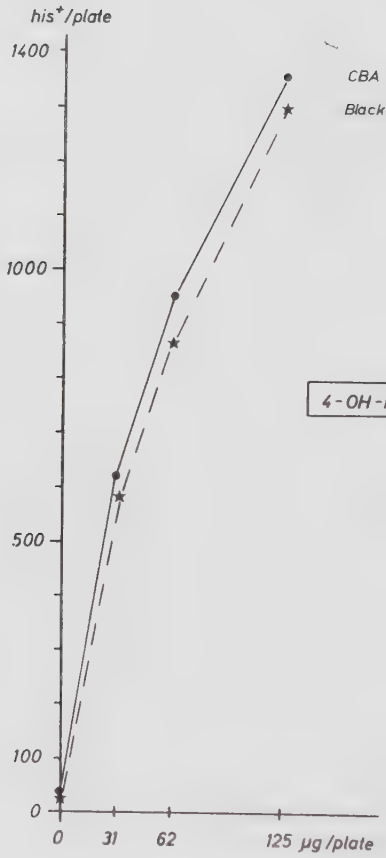


Abb. 13 e: DEK für 4-OH-peroxy-CPA; metabolische Aktivierung: Leber-S9 CBA, C 57 BL; I. und II. Aufarbeitung

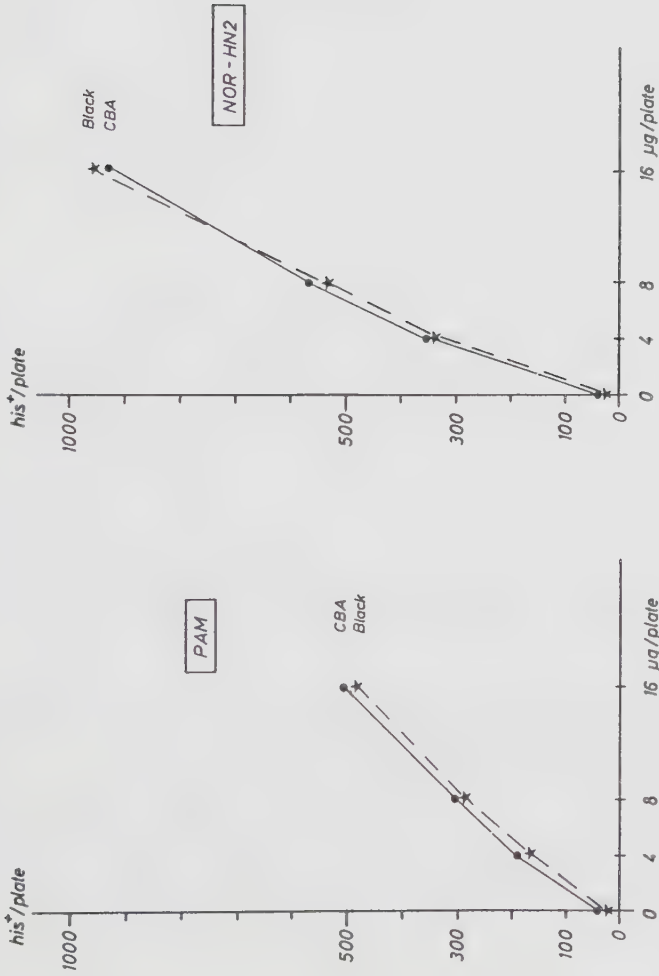


Abb. 13 f: DEK für PAM

Abb. 13 g: DEK für Nor-HN2

metabolische Aktivierung: Leber-S9 CBA, C 57 BL; I. und II. Aufarbeitung

Da die Aktivitätsdifferenz bei CPA am stärksten ausgeprägt war, wurde dieser Effekt im Folgenden an CPA detaillierter untersucht.

Den o.a. Testtieren wurden neben der Leber jeweils auch die Nieren entnommen und zu S9 verarbeitet. Differenziert wurde zusätzlich nach Nieren mit Nebenniere (+NNR) und Nieren, denen die Nebennieren entfernt wurde (-NNR). Die damit erhaltenen DEK für CPA unterscheiden sich deutlich nach Art und Herkunft der S9-Fraktionen (Abb. 14). Die S9-Fraktionen aus Nieren mit Nebenniere (+NNR) und Nieren ohne Nebenniere (-NNR) des Stammes C 57 BL zeigen keinen Unterschied in der metabolischen Aktivität. Die DEK für CPA sind für beide Fraktionen identisch. Sie entsprechen den mit Leber-S9 von C 57 BL erstellten DEK für CPA.

Die Nieren-S9-Fraktionen des Stammes CBA unterscheiden sich davon in mehreren Punkten. Die S9-Fraktion aus Niere mit Nebenniere (+NNR) hat die gleiche metabolische Aktivität wie CBA-Leber-S9. Die DEK für mit CBA-Nieren-S9 (+NNR) aktiviertes CPA verläuft damit über den mit den C 57 BL Nieren-S9-Fraktionen erstellten Kurven. Ohne Nebennieren hergestelltes Nieren-S9 (-NNR) vom Stamm CBA zeigt dagegen ein deutlich geringeres Aktivierungsvermögen für CPA. Die damit erhaltenen Werte liegen sogar noch unter denen von C 57 BL-Nieren-S9 (Abb. 14). Dieser Unterschied zwischen den CBA-Nieren-S9-Fraktionen ist ebenfalls reproduzierbar, für 250 ug CPA/Platte an der Signifikanzgrenze für 500 ug CPA/Platte signifikant ($p < 0.01$) (s.Tab 3).

Die in vivo Metabolisierung von CPA zu mutagenen Metaboliten bei den Mäusestämmen CBA und C 57 BL wurde aus Leber- und Nieren -S9 bestimmt. Diese S9-Fraktionen waren aus Gewebe aufgearbeitet, das den Testtieren (11. Tag Schwangerschaft) nach Injektion von 20 mg CPA/kg KG s. c. entnommen worden war. Abb. 15 a zeigt eine gering erhöhte Mutagenität der vorbehandelten S9-Fraktionen gegenüber der Spontankontrolle. Leber- und Nieren - S9-Fraktionen unterscheiden sich nicht in ihrer Aktivität.

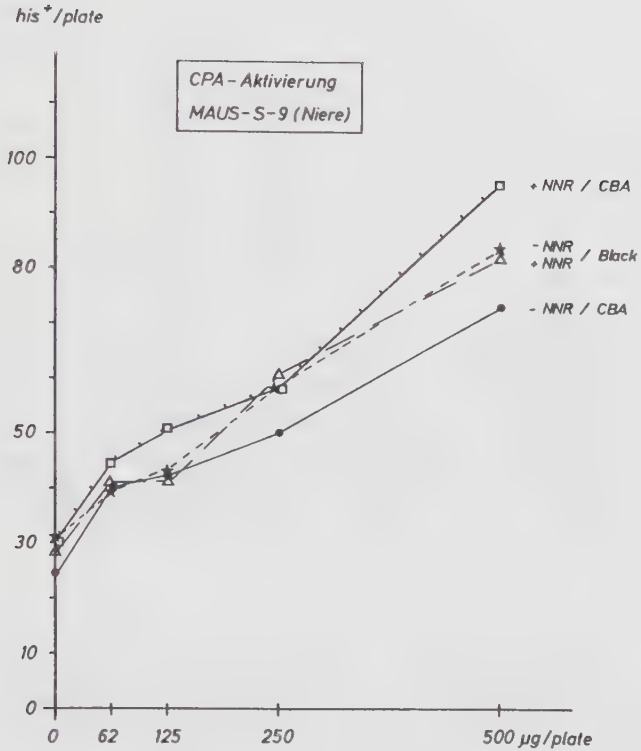


Abb. 14: CPA-Aktivierung durch Einsatz von S9 aus Nierengewebe mit Nebenniere (+NNR) bzw. Nierengewebe ohne Nebenniere (-NNR). Die Nieren wurden schwangeren Mäusen (11. Tag) der Stämme CBA und C 57 BL entnommen.

Zur Interpretation der Kurven s. Text.

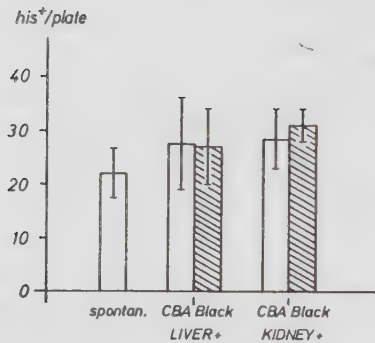


Abb. 15 a: Mutagenität von S9-Fractionen aus Leber- bzw. Nieren(-NNR)gewebe von Mäusen (Stämme CBA, C 57 BL; 11. Tag Schwangerschaft), denen 10min vor Entnahme 20 mg CPA/kg KG s. c. injiziert worden war (in vivo Metabolisierung). Die Spontankontrolle ist aus Werten unvorbehandelter Leber- und Nieren-S9-Fractionen berechnet.

Die Kapazität der S9-Fractionen aus in vivo mit CPA vorbehandelten Tieren für die in vitro Aktivierung von CPA ist in Abb. 15 b dargestellt. Auffällig ist die signifikant verminderte Metabolisierungskapazität für CPA der in vivo vorbehandelten S9-Fractionen gegenüber den nicht vorbehandelten (s. Tab. 4). Bei den in vivo vorbehandelten Leber-S9-Fractionen ist zusätzlich der Aktivierungsunterschied reduziert, der bei den nicht vorbehandelten Leber-S9-Fractionen zwischen den Stämmen CBA und C 57 BL auftritt (s. Tab. 4).

Die in vitro Aktivierungskapazität für CPA von Nieren-S9-Fractionen aus in vivo mit 20 mg CPA/kg vorbehandelten Tieren ist für die Aufarbeitungen von beiden Stämmen - CBA und C 57 BL - fast identisch. Gegenüber der Metabolisierungskapazität mit nicht in vivo vorbehandelten Nieren - mit oder ohne Nebennieren (⁺NNR) (s. Abb. 14) sind auch diese Werte signifikant reduziert (s. Tab. 3), die dort aufgetretenen Unterschiede eliminiert.

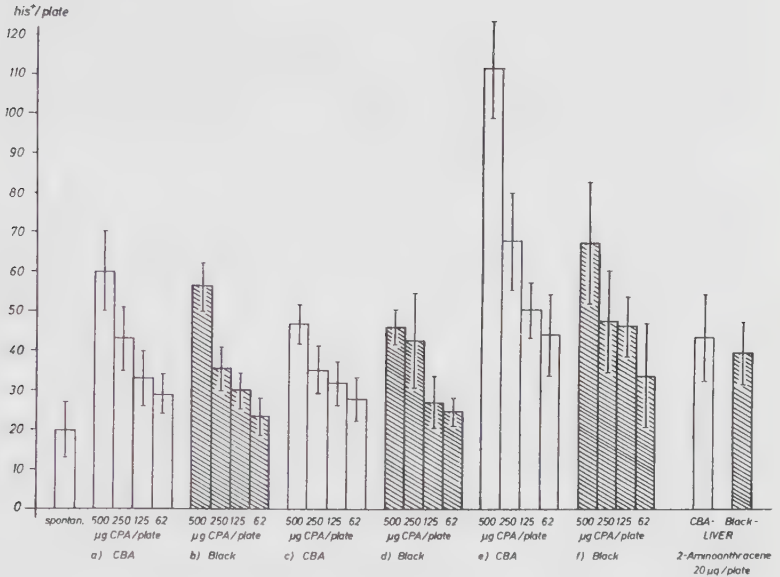


Abb. 15 b: DEK für CPA unter Verwendung von in vivo unterschiedlich vorbehandelten S9-Fractionen.

Histogramme a-d: schwangeren Mäusen wurde am Tag 11 20 mg CPA/kg KG s. c. injiziert. Leber und Nieren (-NNR) wurden 10min nach Injektion entnommen und aufgearbeitet.

Mäusestämme: CBA und C 57 BL (Black)

Histogramme e-f: Leber-S9-Fractionen aus nicht vorbehandelten Tieren (schwanger; 11. Tag p. c.).

- a) DEK für CPA; Leber-S9 CBA ; Vorbeh. in vivo 20 mg CPA/kg
- b) DEK für CPA; Leber-S9 C 57 BL; Vorbeh. in vivo 20 mg CPA/kg
- c) DEK für CPA; Nieren-S9 CBA ; Vorbeh. in vivo 20 mg CPA/kg
- d) DEK für CPA; Nieren-S9 C 57 BL; Vorbeh. in vivo 20 mg CPA/kg
- e) DEK für CPA; Leber-S9 CBA ; -----
- f) DEK für CPA; Leber-S9 C 57 BL; -----
- 20 ug 2-AA ; Leber-S9 CBA, C 57 BL -----

Zur Interpretation s. Text und Tab. 4.

Tab. 3: Unterschiede in der Mutagenität von aktiviertem CPA. Metabolische Aktivierung unter Einsatz von Nieren-S9. Einfluß der Nebenniere und einer in vivo Vorbehandlung der Testtiere mit 20 mg CPA/kg KG auf die metabolische Aktivität der verwendeten S9-Fractionen. Signifikanzen berechnet nach dem t-Test. Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p (zu Abb. 14, 15 b). (Testtiere: schwanger; 11. Tag p. c.)

Stamm	Dosis			
	500	250	125	62 ug CPA/Platte
<u>X</u>				
CBA	$\frac{-\text{NNR}}{+\text{NNR}}$	p < 0.01	keine Unterschiede nachweisbar	
CBA	$\frac{-\text{NNR}}{+\text{CPA}}$	p < 0.001	p < 0.05	p < 0.01
CBA	$\frac{+\text{NNR}}{+\text{CPA}}$	p < 0.001	p < 0.01	p < 0.001
C 57 BL	$\frac{-\text{NNR}}{+\text{NNR}}$	keine Unterschiede nachweisbar		
C 57 BL	$\frac{-\text{NNR}}{+\text{CPA}}$	p < 0.001	p < 0.05	p < 0.001
C 57 BL	$\frac{+\text{NNR}}{+\text{CPA}}$	p < 0.001	p < 0.05	p < 0.01

X: Art der Nieren-S9-Fraktion:

(+NNR) : S9-Aufarbeitung aus Niere und Nebenniere

(-NNR) : S9-Aufarbeitung aus Niere ohne Nebenniere

(+CPA) : in vivo-Vorbehandlung der Mäuse mit 20 mg CPA/kg KG s. c.

10min vor Nierenentnahme; S9-Aufarbeitung aus vorbehandelter Niere ohne Nebenniere

Tab. 4: Unterschiede in der Mutagenität von aktiviertem CPA. Einfluß einer in vivo Vorbehandlung der Teststämme CBA und C 57 BL mit 20 mg CPA/kg KG auf die metabolische Aktivität der aus diesen Tieren gewonnenen Leber-S9-Fractionen. Signifikanzen berechnet nach dem t-Test. Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p (zu Abb. 15 b). (Testtiere: schwanger; 11. Tag p. c.)

Stamm	Dosis			
	500	250	125	62 ug CPA/Platte
	<u>X</u>			
<u>CBA</u>	+	p <0.001	p <0.001	p <0.001
CBA	-			
<u>C 57 BL</u>	+	p <0.05	p <0.01	p <0.001
C 57 BL	-			
<u>CBA</u>	+	keine Unterschiede nachweisbar		
C 57 BL	-			
<u>CBA</u>	-	p <0.001	p <0.05	keine Unterschiede nachweisbar
C 57 BL	-			

X: in vivo-Vorbehandlung der für die S9-Aufarbeitung entnommenen Lebern:

(+) : 20 mg CPA/kg KG 10min vor Leberentnahme s. c. injiziert

(-) : keine Vorbehandlung

III.2.1.3. Einfluß eines Monoaminoxidase-Hemmers (MAO-I) auf die Aktivierung von CPA

Aufgrund der Tatsache, daß das Cytochrom-P450-Monooxygenase-System im oxidativen Abbau oft in engem Zusammenspiel mit Monoaminoxidasen (MAO) auftritt, sollte an einem Beispiel die Interaktion der enzymatischen CPA-Aktivierung in vitro mit einem Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-I) getestet werden. Eine Beteiligung einer Monoaminoxidase speziell an enzymatischen Reaktionen an den Hauptkandidaten für die mutagenen Eigenschaften von CPA - PAM und Nor-HN2 - ist durchaus denkbar. Ausgewählt wurde der einzige z. Zt. in der BRD im Handel befindliche MAO-I 'Tranlylcypromin' (trans-2-Phenylcyclopropylamin). Diese Substanz wird in der psychiatrischen Pharmakotherapie verwendet. Es ist bekannt, daß sie in ihrer Eigenschaft als MAO-I in den Leberstoffwechsel eingreift und zu Leberschäden führen kann.

Die Dosierung im Test orientierte sich an der für das Pharmakon empfohlenen maximalen Körperdosis/d beim Menschen. Die Substanz liegt dann bei theoretisch angenommener Gleichverteilung im Gesamtgewebe des Menschen in einer Konzentration von 0.33×10^{-4} M vor. Im Test wurden als Endkonzentrationen in den Proben 0.33×10^{-2} , 0.33×10^{-4} und 0.33×10^{-6} M MAO-I eingesetzt. Zu Parallelansätzen des sonst unverändert belassenen on-plate-assay (s. II.6) mit dem Teststamm TA 1535 wurde zu den Proben jeweils sterile MAO-I-Lösung zu einer der gewünschten Endkonzentrationen pipettiert. Für die Aktivierung von CPA im Test (S9 - Mix) wurden Leber-S9-Fraktionen der Stämme CBA und C 57 BL verwendet. Alle anderen Bedingungen des Assay blieben unverändert.

Die Resultate sind in Abb. 16 a, b dargestellt. Die Werte für 0.33×10^{-6} M MAO-I-Zusatz unterscheiden sich nicht von denen ohne Zusätze. Sie sind daher nicht aufgeführt. Für die Aktivierung mit CBA-Leber-S9 ist über den gesamten Dosisbereich eine Reduzierung der Mutantenzahlen durch Zusatz des MAO-I feststellbar. Bei C 57 BL tritt dieser Effekt ebenfalls auf, ist im unteren CPA-Dosisbereich aber kaum noch ausgeprägt. Durchschnittlich beträgt der Verlust der metabolischen Aktivität durch Zusatz des MAO-I über den gesamten getesteten CPA-Dosisbereich bei CBA-Leber-S9 20 % für

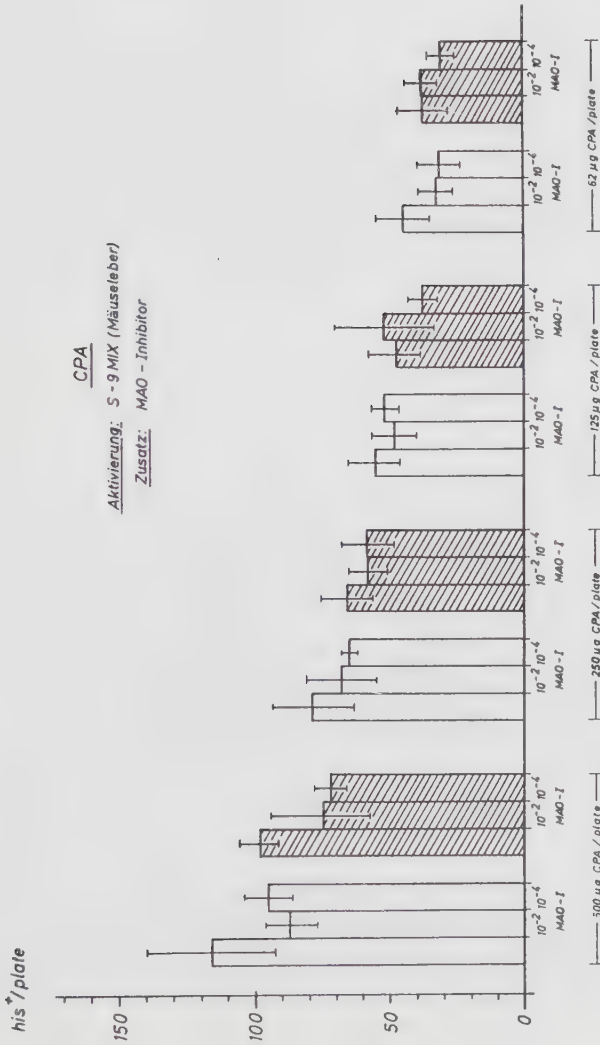


Abb. 16 a: Metabolische Aktivierung von CPA durch Leber-S9 der Stämme CBA (helle Balken) und C 57 BL (schraffierte Balken) unter dem zusätzlichen Einfluß eines Monoaminoxidase-Hemmers (MAO-I). Die eingesetzten Konzentrationen des MAO-I in den Proben betragen $0.33 \times 10^{-2} \text{ M}$ (10^{-2}) bzw. $0.33 \times 10^{-4} \text{ M}$ (10^{-4}). Die Mäuse waren bei Leberentnahme am Tag 11 p. c. schwanger. Versuchsdurchführung und nähere Einzelheiten s. Text.

0.33×10^{-4} M und 0.33×10^{-2} M MAO-I, sowie bei C 57 BL-Leber-S9 10 % für 0.33×10^{-2} M MAO-I und 20 % für 0.33×10^{-4} M MAO-I. Eine differenzierte Auswertung ist weder sinnvoll noch möglich, dafür ist der hier sichtbare Einfluß des MAO-I auf die Aktivierung von CPA zu gering.

Anzumerken ist, daß 0.33×10^{-2} M MAO-I-Zusatz bei beiden S9-Fractionen eine Erhöhung der spontanen Mutationsrate (+ 16 % (CBA), + 38 % (C 57 BL)), sowie eine deutliche Erhöhung der Mutationsrate für das Referenzmutagen 2-AA (+ 64 % (CBA), + 40 % (C 57 BL)) bewirkte. Kein Einfluß auf Spontanmutationsraten und Referenzmutagenaktivierung traten bei 0.33×10^{-4} M MAO-I auf (Ausnahme: C 57 BL, 2-AA - 19 %) (Abb. 16 b).

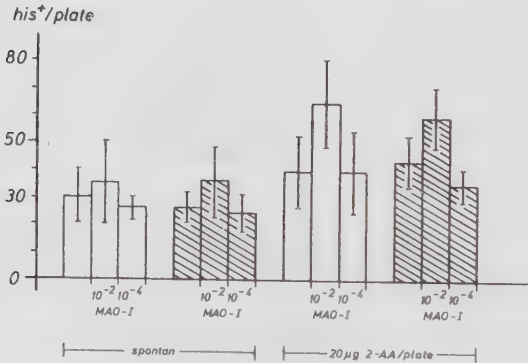


Abb. 16 b: Einfluß eines MAO-I in den Konzentrationen 0.33×10^{-4} M und 0.33×10^{-2} M auf die Spontanmutationsrate und die Aktivierung von 2-AA (s. Text).

III.2.1.4. Einfluß einer Monoaminoxidase (MAO; EC 1.4.3.4.) auf die Aktivierung von CPA

Aus den in III.2.1.3. erläuterten Gründen wurde auch die Wirkung einer MAO auf die metabolische Aktivierung von CPA getestet. Verwendet wurde MAO aus Rinderserum (Spezifikation: 1 Unit MAO oxidiert bei pH 7.4 und 25⁰ C pro Minute 1.0 umol Benzylamin zu Benzaldehyd). Mit 250 ug CPA/Platte wurde eine DEK für das Enzym erstellt (Abb. 17). Bei unverdünntem Zusatz enthielt der Test-Mix 0.054 Units MAO ($\hat{=}$ 1.5×10^{-2} U/ml). Die übrigen Verdünnungen der MAO vor Zusatz zum Test-Mix sind aus der Abb. 17 zu entnehmen.

Die statistischen Angaben zu Abb. 17 sind in Tab. 5 aufgeführt.

Die relevanten Fakten dieses Experiments sind:

1. MAO-Zusatz in unverdünnter Form (Endkonzentration: 1.5×10^{-2} U/ml) zum Test-Mix -S9 bewirkt eine Metabolisierung von CPA zu mutagenen Produkten in gleichem Ausmaß wie der alleinige Zusatz von C 57 BL-Leber-S9-Mix.
2. MAO-Zusatz in unverdünnter Form (Endkonz.: 1.5×10^{-2} U/ml) zum Test-Mix + C 57 BL-Leber S9-Mix bewirkt eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität von C 57 BL-Leber-S9 (s. Tab. 5).
3. Auffällig ist der deutliche Einfluß der MAO im -S9- und Black-Block, während der CBA-Block kaum Unterschiede infolge des MAO-Zusatzes aufweist.
4. Das Wirkungsmaximum der MAO liegt für -S9 bei 1.5×10^{-2} U/ml (+MAO), sowie für CBA- und C 57 BL-Leber-S9 bei 3.0×10^{-4} U/ml (1:50). Die Aktivität fällt für -S9 mit zunehmender Verdünnung kontinuierlich ab.

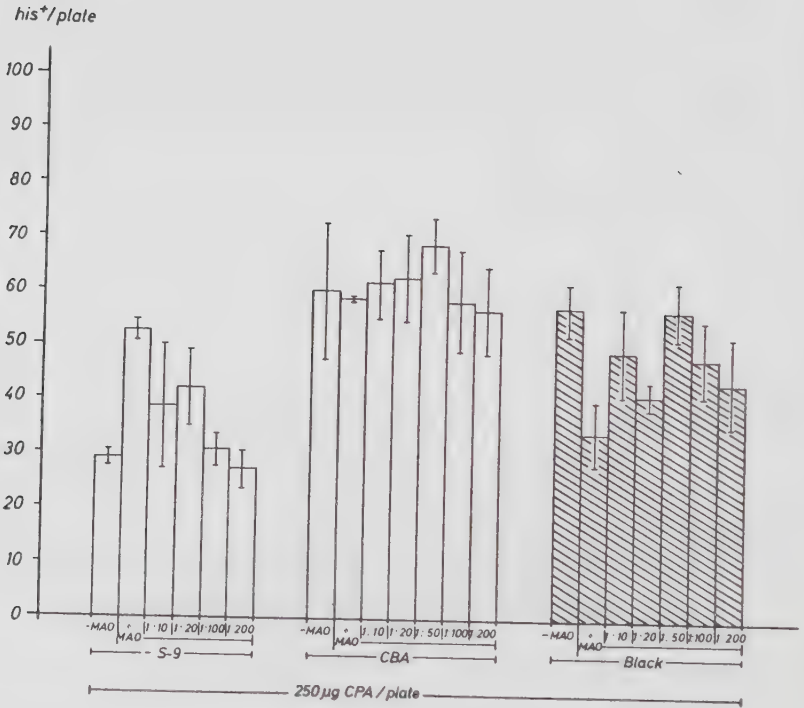


Abb. 17: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen MAO auf die Aktivierung von 250 µg CPA/Platte (DEK der MAO). Der jeweils erste Balken in jedem Block gibt die Mutantenzahl ohne MAO-Zusatz als Referenz an. Weitere Angaben s. Text.

Tab. 5a: Unterschiede in der CPA-Aktivierung durch Zusatz einer Monoamin-oxidase (MAO) zu dem zur in vitro Aktivierung verwendeten S9-Mix (zu Abb. 17). Einzelheiten s.Text. (CPA-Konzentration: 250 µg/plate). Berechnet ist die Signifikanz nach dem t-Test, angegeben die Irrtumswahrscheinlichkeit p.

Stamm	Leber	MAO-Zusatz					
	-S9						
-	-S9	+MAO	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200
	-S9	-MAO	-MAO	-MAO	-MAO	-MAO	-MAO
	p	< 0.01	--	< 0.01	n.t.	--	--
-	-S9	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	
	-S9	+MAO	+MAO	+MAO	+MAO	+MAO	+MAO
	p	--	--	n.t.	< 0.001	< 0.001	
<u>CBA</u> CBA	+S9	keinerlei statistisch signifikante Unterschiede in diesem Block nachweisbar					
	+S9						
<u>C57 BL</u> C57 BL	+S9	+MAO	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200
	+S9	-MAO	-MAO	-MAO	-MAO	-MAO	-MAO
	p	< 0.01	--	< 0.01	--	--	< 0.05
<u>C57 BL</u> C57 BL	+S9	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	
	+S9	+MAO	+MAO	+MAO	+MAO	+MAO	+MAO
	p	--	--	< 0.01	--	--	

-- : nicht signifikant ; n.t. : nicht getestet

Tab. 5b: Unterschiede in der CPA-Aktivierung durch Zusatz einer Monoamin-oxidase (MAO) zu dem zur in vitro Aktivierung verwendeten S9-Mix (zu Abb. 17). Einzelheiten s. Text. (CPA-Konzentration: 250 µg/plate). Berechnet ist die Signifikanz nach dem t-Test, angegeben die Irrtumswahrscheinlichkeit p.

Stamm	Leber -S9	MAO-Zusatz			
--- CBA	-S9	-MAO	+MAO	+MAO	-MAO
	+S9	+MAO	+MAO	-MAO	-MAO
	p	< 0,01	--	--	< 0,05
--- C57 BL	-S9	-MAO	+MAO	+MAO	-MAO
	+S9	+MAO	+MAO	-MAO	-MAO
	p	--	< 0,05	--	< 0,01
CBA C57 BL	+S9	-MAO	+MAO	+MAO	-MAO
	+S9	+MAO	+MAO	-MAO	-MAO
	p	< 0,05	< 0,01	--	--

-- : nicht signifikant ; n.t. : nicht getestet

In einem ergänzenden Experiment wurde getestet, welchen Einfluß der gleichzeitige Zusatz der Monoaminoxidase (MAO) und des Monoaminoxidase-Hemmers (MAO-I) auf die Aktivierung von CPA ausübt. Für die MAO wurden die aus dem unter II.2.1.4. beschriebenen Experiment wirksamsten Konzentrationen ausgewählt (1.5×10^{-3} U/ml (1:10) und 5.0×10^{-4} U/ml (1:50)), der MAO-I in den Endkonzentrationen 0.33×10^{-4} M und 0.33×10^{-2} M verwendet. Theoretisch sollten sich die Effekte aufheben, die bei Zusatz nur jeweils einer der beiden Substanzen zum Testansatz auftreten. Voraussetzung dafür wäre allerdings, daß ihre Wechselwirkung mit dem zur Aktivierung verwendeten Leber-S9 nur gering ist, sie also bevorzugt miteinander reagieren.

Die Resultate zeigt Abb. 18 a - c.

Als Ergebnis des Versuchs läßt sich zusammenfassen:

1. Der gleichzeitige Zusatz von MAO und dem MAO-I führt bei den höheren Dosen von CPA (250, 500 ug/Platte) zu einer Verminderung der Mutationsraten, unabhängig von der Herkunft der Leber-S9-Fraktion (CBA oder C 57 BL). Bei 62 und 125 ug CPA/Platte werden durch die Zusätze kaum Veränderungen bei den Mutationsraten bewirkt.
2. Die Spontanmutationsrate ist allein bei MAO-Zusatz 1:10 (1.5×10^{-3} U/ml) zu den Testansätzen mit CBA- bzw. C 57 BL-Leber-S9 um ca. 30 % erhöht. Alle anderen Zusatzkombinationen haben keinen Einfluß auf die Spontanrate.
3. Die Mutationsraten für das Referenzmutagen 2-AA unterscheiden sich ebenfalls bei allen experimentellen Bedingungen kaum voneinander. Die höhere Standardabweichung resultiert hier aus der geringen Versuchszahl (n=2).
4. Bei genauer Betrachtung der Darstellungen in Abb. 16 a, b (DEK für CPA bei alleinigem Zusatz des MAO-I) und Abb. 17 (DEK für die MAO bei 250 ug CPA/Platte) ergibt sich der Eindruck, daß sich die dort nachgewiesenen Einzeleffekte bei gleichzeitigem Zusatz beider Substanzen

(MAO und MAO-I) zum Testansatz in ihrer Wirkung addieren. Sie reagieren also nicht bevorzugt miteinander. So zeigt CBA-Leber-S9 fast ausschließlich die durch den MAO-I verursachten Veränderungen in der Aktivierungskapazität (s. Abb. 16 a, b; sowie Abb. 17: alleiniger MAO-Zusatz hatte keinen Einfluß auf das Aktivierungsvermögen von CBA-Leber-S9). Bei C 57 BL-Leber-S9 sprechen die hier erhaltenen Daten für die Addition der - wenn auch relativ geringen - Einzeleffekte aus den Werten aus Abb. 16 a, b und Abb. 17.

Zu den Abb. 18 a - c: Darstellung der Spontanmutationsrate, der Mutationsrate für 20 µg 2-AA/Platte (Referenzmutagen) sowie der Dosiseffektkurve (DEK) für CPA ohne metabolische Aktivierung (-S9), Aktivierung durch CBA-Leber-S9 (helle Balken) oder Aktivierung durch C 57 BL-Leber-S9 (schraffierte Balken) unter Einfluß der jeweils unter den Graphiken aufgeführten Zusätze.

(+MAO: Zusatz von Monoaminoxidase, Endkonzentrationen: $1:10 \triangleq 1.5 \times 10^{-3}$ U/ml, $1:50 \triangleq 5.0 \times 10^{-4}$ U/ml;

+MAO-I: Zusatz eines Monoaminoxidase-Hemmers (Tranylcypromin), Endkonzentrationen: $10^{-4} \triangleq 0.33 \times 10^{-4}$ M, $10^{-2} \triangleq 0.33 \times 10^{-2}$ M)

n. t.: nicht getestet

Zur Versuchsdurchführung und Interpretation s. Text.

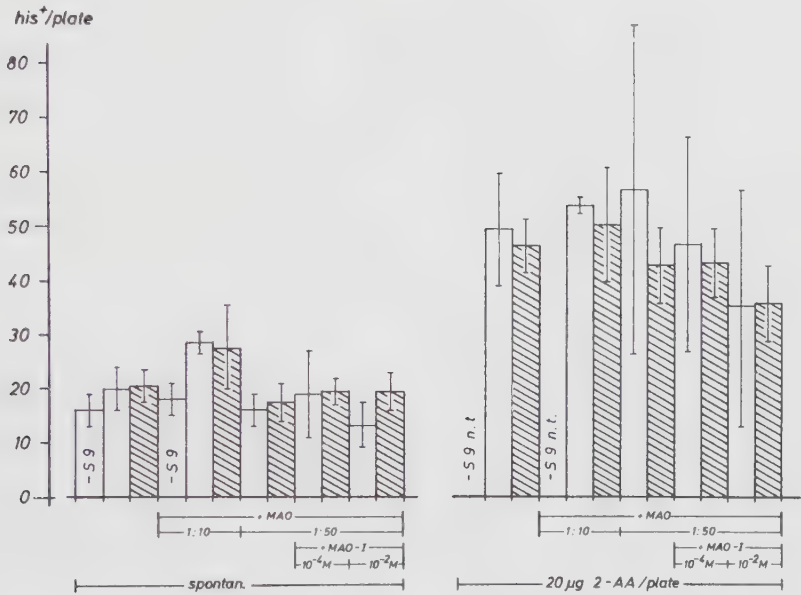


Abb. 18 a: Spontanmutationsrate und Mutagenität von 20 µg 2-AA/Platte.
Einfluß einer MAO sowie des gemeinsamen Zusatzes einer MAO
und eines MAO-I auf die Aktivierung.

Grundaktivierung: -S9: keine Aktivierung; (-S9-Mix)

schraffierte Balken: +S9-Mix; C 57 BL-Leber-S9

helle Balken: +S9-Mix; CBA-Leber-S9

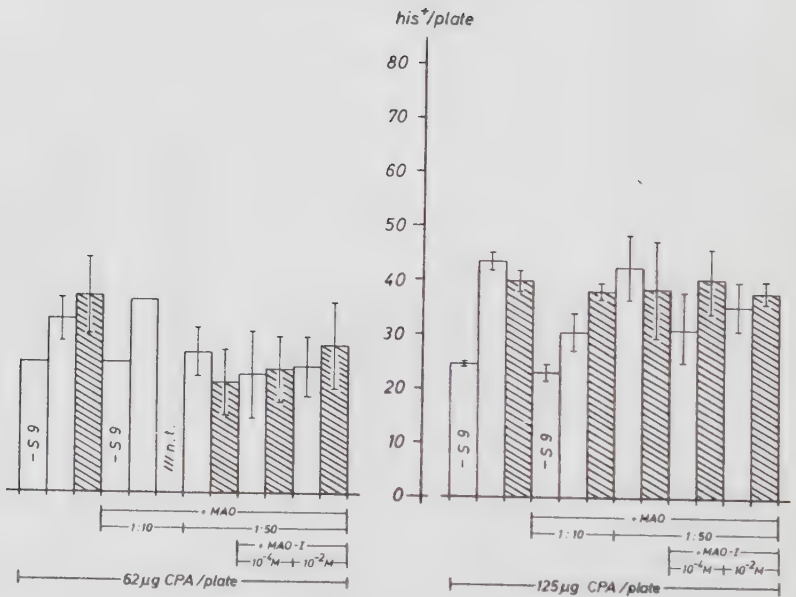


Abb. 18 b: Mutagenität von aktiviertem CPA bei Dosen von 62 und 125 µg CPA/Platte. Einfluß einer MAO sowie des gemeinsamen Zusatzes einer MAO und eines MAO-I auf die Aktivierung.

Grundaktivierung: -S9: keine Aktivierung; (-S9-Mix)

schraffierte Balken: +S9-Mix; C 57 BL-Leber-S9

helle Balken: +S9-Mix; CBA-Leber-S9

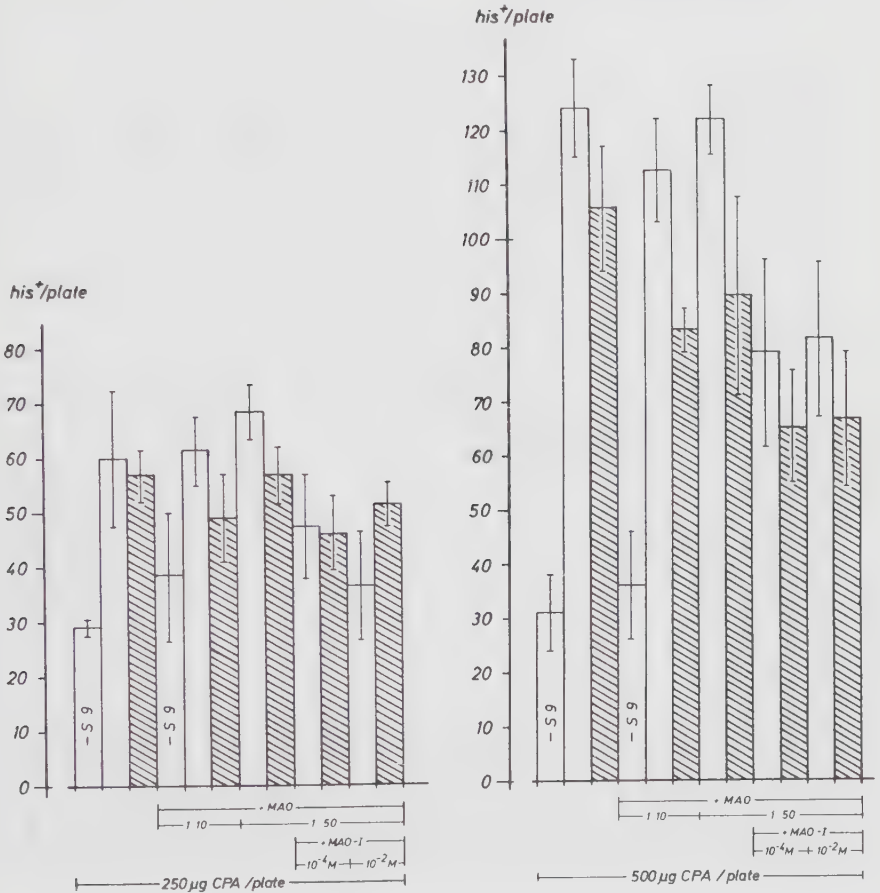


Abb. 18 c: Mutagenität von aktiviertem CPA bei Dosen von 250 und 500 µg CPA/Platte. Einfluß einer MAO sowie des gemeinsamen Zusatzes einer MAO und eines MAO-I auf die Aktivierung.

Grundaktivierung: -S9: keine Aktivierung; (-S9-Mix)

schraffierte Balken: +S9-Mix; C 57 BL-Leber-S9

helle Balken: +S9-Mix; CBA-Leber-S9

III.2.2. Induktion von SCEs

Getestet wurden CPA, 4-OH-peroxy-CPA, 4-keto-CPA, Carboxy-PA, PAM und NOR-HN2.

Die beschriebenen Versuche wurden in der AG von Herrn Prof. Dr. G. Obe (Inst. f. Genetik der FU-Berlin) durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zellart: menschliche Lymphocyten

Methode:

Die Zellen wurden in TC - 199 Medium bei 37⁰ C einer 24h-Dauerbehandlung mit den o.a. Substanzen ausgesetzt. Es erfolgte keinerlei Zusatz von metabolischen Aktivierungssystemen.

Die Aufarbeitung und Auswertung erfolgte nach dem international üblichen Standardprotokoll.

Resultate:

Die Substanzen wurden im Dosisbereich von 1.0×10^{-8} M - 1.0×10^{-3} M Endkonzentration CPA im Experimentalansatz getestet. Die SCE-Raten sind in Tab. 6 aufgeführt. Für die mutagene Aktivität der nicht extern aktivierten Substanzen auf cytogenetischer Ebene ergibt sich folgende Reihenfolge:

$\text{PAM} \geq 4\text{-OH-peroxy-CPA} > \text{Nor-HN2} > \text{Carboxy-PA} \gg 4\text{-keto-CPA} > \text{CPA}$

Ab Konzentrationen von 1.0×10^{-5} M wirken 4-OH-peroxy-CPA und Nor-HN2, ab 1.0×10^{-4} M wirkt auch PAM toxisch auf die eingesetzten Lymphocyten. Für alle getesteten Substanzen läßt sich eine klare Dosis-Effekt-Beziehung erkennen.

Konzentration	CPA	4-OH-peroxy-CPA	4-Keto-CPA	Carboxy-PA	pAm	Not-HN2
0	6.7 ± 3.1	5.28 ± 2.23 (4/85)	5.5 ± 3.4 (2/54)	7.05 ± 2.99 (2/70)	7.84 ± 4.12 (4/99)	8.19 ± 3.67 (4/120)
$1. \times 10^{-8} M$	--	5.52 ± 2.18 (1/25)	--	--	6.82 ± 2.84 (2/50)	7.76 ± 3.0 (2/50)
$1. \times 10^{-7} M$	--	9.80 ± 2.75 (1/25)	--	--	9.2 ± 3.24 (2/50)	7.62 ± 2.67 (2/45)
$1. \times 10^{-6} M$	--	22.27 ± 6.8 (3/100)	4.88 ± 2.59 (2/70)	7.73 ± 3.25 (2/65)	31.54 ± 13.9 (4/90)	17.33 ± 4.14 (4/87)
$1. \times 10^{-5} M$	--	toxisch	6.3 ± 2.79 (2/75)	16.72 ± 5.24 (2/56)	89.2 ± 12.4 (2/30)	toxisch ¹
$1. \times 10^{-4} M$	8.2 ± 3.7	toxisch	18.69 ± 6.1 (2/65)	81.4 ± 26.7 (2/45)	toxisch	toxisch
$1. \times 10^{-3} M$	15.6 ± 5.6	--	--	--	--	--

¹ : nur 1 Mitose

Tab. 6: Direkte Mutagenität von CPA und CPA-Metaboliten auf menschliche Lymphocyten in 24h-Dauerbehandlung. Eine zusätzliche in vitro Metabolisierung durch Zusatz von S9-Mix erfolgte nicht. Angegeben sind die SCE-Raten $\pm$ Standardabweichung; in Klammern (Anzahl der unabh.Versuche/Anzahl der ausgewerteten Mitosen).

III.2.3. Teratologische Daten

Getestet wurde die Wirkung von CPA auf die Mäusestämme CBA und C 57 BL.

Die Experimente wurden von Frau Dr. U. Kocher-Becker und Frau L. Becker in der Arbeitsgruppe für Exp. Teratologie und Embryologische Genetik (Prof. Dr. W. Kocher) durchgeführt und die Resultate freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Methode:

Weibchen der Stämme CBA und C 57 BL wurden mit entsprechenden Männchen zwischen 7 - 10 Uhr vorm. gepaart. Der Tag der Paarung ist der Tag 0 der Trächtigkeit. Die Tiere wurden in regelmäßigem Tag-/Nachtrhythmus gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum.

Am Tag 11 der Trächtigkeit wurde den Tieren CPA (gelöst in 0.9 % NaCl) in Dosen von 9, 12 oder 20 mg/kg KG i. p. injiziert. Kontrolltiere erhielten 0.9 % NaCl-Lösung ebenfalls i. p..

Die Feten wurden am Tag 16 durch Kaiserschnitt entnommen und die Zahl der Implantationen, Resorptionen und lebenden Feten sowie die Gewichte der lebenden Feten bestimmt (s. Tab. 7). Die lebenden Feten wurden anschließend unter dem Stereomikroskop auf äußere Mißbildungen untersucht. Die angegebene Mißbildungsrate ist auf die Zahl der lebend entnommenen Feten bezogen.

Begriffsbestimmungen:

Das Extremitätenskelett von Vierfüßlern besteht aus 3 Hauptabschnitten:

1. Stylopodium: Oberarm-; -schenkelknochen
2. Zeugopodium: Elle, Speiche; Schien-, Wadenbein
3. Autopodium : Hand-/ Fußknochen bestehend aus Wurzel-/ Mittel- und Finger-/Zehenknochen

Phalanx : Bezeichnung für den einzelnen Finger-/ Zehenknochen

Strahl : Bezeichnung eines der 5 Glieder des Autopodiums

Polydactylie : Vervielfachung/ Aufspaltung von Finger-/ Zehenstrahlen

Syndactylie : Verschmelzung von Finger-/ Zehenstrahlen

Oligodactylie : Fehlen eines oder mehrerer Finger-/ Zehenstrahlen

Definition : Als schwache Oligodactylie wird das Fehlen von 1-2 Strahlen, als starke Oligodactylie das Fehlen von mehr als 3 Strahlen bezeichnet

Adactylie : vollständiges Fehlen aller Finger-/ Zehenanlagen.

Exencephalis : Fehlen des gesamten Hirnschädels

Dosisabhängige Prädominanz von Mißbildungstypen des Autopodiums:

1. Polydactylie

2. Syndactylie

3. Oligodactylie

4. Adactylie

Schwere Formen von Oligo- und Adactylie sind von Reduktionen im Zeugopodium begleitet. Auch bei Polydactylie kann es zu Reduktionen im Zeugopodium kommen.

R e s u l t a t e

Stamm: CBA

Außerlich erkennbare Mißbildungen nach CPA-Behandlung am Tag 11 p.c.
(s. a. Abb. 20 und Tab. 8).

- 9 mg CPA/kg KG:

Keine äußerlich erkennbaren Mißbildungen der lebend entnommenen Feten.

- 12 mg CPA/kg KG:

70 % der lebend entnommenen Feten sind mißbildet.

Körpergröße : geringfügig reduziert

Schwanzlänge : geringfügig reduziert

Gelegentlich treten kleine Ödeme oder Hämatome auf.

Gaumenspalte : selten (2.3 %)

Extremitäten

Vorderextremitäten

(VE) : Polydactylie : gering (4.5 %)

Syndactylie : häufig (41 %)(2. und 3. Phalangen)

schwache Oligodactylie : sehr häufig (61.3 %)

Hinterextremitäten

(HE) : Polydactylie : gering (11.3 %)

Syndactylie : sporadisch (0.8 %)

schwache Oligodactylie : selten (2.3 %)

- 20 mg CPA/kg KG:

100 % der lebend entnommenen Feten sind mißbildet.

Körpergröße : stark reduziert

Schwanzlänge : stark reduziert

Kiefer : stark reduziert (Mikrognathie)

äußere Ohren : stark reduziert

Massive Ödeme an Kopf und/oder Rumpf treten auf (manchmal extrem:
'Monsterchen') (s. Abb. 20 d)

Exencephalie : häufig (17.8 %)

Gaumenspalte : sehr häufig (71.1 %)

Extremitäten

(VE) : Polydactylie : ---
Syndactylie : ---
schwache Oligodactylie : gering (8.9 %)
starke Oligodactylie : gering (17.8 %)
Adactylie : sehr häufig (71.1 %)
zusätzliche Reduzierung des Zeugopodiums

(HE) : Polydactylie : gering (4.4 %)
Syndactylie : häufig (31.1 %)
schwache Oligodactylie : häufig (37.8 %)
starke Oligodactylie : häufig (46.7 %)
Adactylie : gering (4.4 %)

Stamm: C 57 BL

Außerlich erkennbare Mißbildungen nach CPA-Behandlung am Tag 11 p.c.
(s. a. Abb. 19 und Tab. 8).

- 9 mg CPA/kg KG:

18.2 % der lebend entnommenen Feten sind mißbildet.

Extremitäten

(VE) : ---
ausschließlich
(HE) : Polydactylie : (100 %)
(triphalanger 1. Strahl oder triphalanger Zusatzstrahl)

- 12 mg CPA/kg KG:

100 % der lebend entnommenen Feten sind mißbildet.

Körpergröße : stark reduziert
Schwanzlänge : stark reduziert
Kiefer : stark reduziert (Mikrognathie)
äußere Ohren : stark reduziert
Ödeme treten auf
Gaumenspalte : häufig (21.4 %)

Extremitäten

- (VE) : Polydactylie : häufig (21.4 %)
 Syndactylie : häufig (32.2 %)
schwache Oligodactylie : häufig (42.9 %)
- (HE) : Polydactylie : sehr häufig (64.3 %)
 Syndactylie : selten (3.6 %)
schwache Oligodactylie : gering (10.7 %)

- 20 mg CPA/kg KG:

- 100 % der lebend entnommenen Feten sind mißbildet.
- Körpergröße : sehr stark reduziert
- Schwanzlänge : sehr stark reduziert
- Kiefer : sehr stark reduziert (starke Mikrognathie)
- äußere Ohren : sehr häufig vollständig reduziert
- Massive Ödeme an Kopf und/oder Rumpf treten auf.
- Schädelverknöcherung : häufig reduziert
- Exencephalie : ---
- Gaumenspalte : häufig (18.2 %)

Extremitäten

- (VE) : Polydactylie : ---
 Syndactylie : ---
starke Oligodactylie : gering (9.1 %) bei reduziertem Zeugopodium
Adactylie : fast ausschließlich (90.9 %)
- (HE) : Polydactylie : ---
 Syndactylie : ---
schwache Oligodactylie : häufig (36.4 %)
starke Oligodactylie : sehr häufig (63.9 %) bei reduziertem Zeugopodium
Adactylie : ---

Tierstamm	Anzahl der Muttertiere	CPA-Dosis (mg/kg)	Anzahl der Implantat.	Anzahl der Resorpt.	Anzahl der leb. Feten	Anzahl der mißb. Feten der Feten/ Wurf	Gewicht der Feten (g)	Gewichts- differenz im t-Test
CBA	4	--	31	3 (9.7%)	28	--	1.12 ± 0.13	$\angle$ p < 0.01
CBA	8	9	59	4 (6.8%)	55	--	1.02 ± 0.10	$\angle$ p < 0.001
CBA	8	12	65	2 (3.0%)	63	44 (70%)	0.75 ± 0.10	$\angle$ p < 0.001
CBA	5	20	45	--	45	45 (100%)	0.52 ± 0.09	$\angle$ p < 0.001
C57 BL	4	--	26	7 (26.9%)	19	--	1.09 ± 0.07	$\angle$ p < 0.001
C57 BL	6	9	39	6 (15.4%)	33	6 (18.2%)	0.88 ± 0.17	$\angle$ p < 0.001
C57 BL	6	12	40	9 (22.5%)	30 ^x	30 (100%)	0.59 ± 0.07	$\angle$ p < 0.001
C57 BL	4	20	16	5 (31.3%)	11	11 (100%)	0.42 ± 0.06	$\angle$ p < 0.001

Tab. 7: Stammdaten von CBA- und C57 BL-Mäusen, sowie teratogene Wirkungen durch Behandlung dieser Mäuse mit unterschiedlichen CPA-Dosen am Tag 11 p.c.
Die Fetengewichte sind mit dem t-Test verglichen.

^x: 1 Fetus tot

Dosis	9 mg CPA/kg		12 mg CPA/kg		20 mg CPA/kg	
Tierstamm	CBA	C57 BL	CBA	C57 BL	CBA	C57 BL
Polydactylie der VE	-	-	4.5%	21.4%	-	-
Polydactylie der HE	-	100%	11.3%	64.3%	4.4%	-
Syndactylie der VE	-	-	41.0%	32.2%	2.2%	-
Syndactylie der HE	-	-	6.8%	3.6%	31.1%	-
schwache Oligo-dactylie der VE	-	-	61.3%	42.9%	8.9%	-
schwache Oligo-dactylie der HE	-	-	2.3%	10.7%	37.8%	63.6%
starke Oligo-dactylie der VE	-	-	-	-	17.8%	9.1%
starke Oligo-dactylie der HE	-	-	-	-	46.7%	36.4%
Adactylie der VE	-	-	-	-	71.1%	90.9%
Adactylie der HE	-	-	-	-	4.4%	-
Gaumenspalte	-	-	2.3%	21.4%	71.1%	18.2%
Mißbildungsrate (% mißbildeter Feten/lebende Feten)	0.0%	18.2%	70 %	100 %	100 %	100 %

Tab. 8: Realisation verschiedener Mißbildungen bei CBA- und C57 BL-Mäusen nach einmaliger Behandlung mit unterschiedlichen CPA-Dosen am Tag 11 der Entwicklung. Die %-Werte sind von der Anzahl der mißbildeten Feten berechnet.

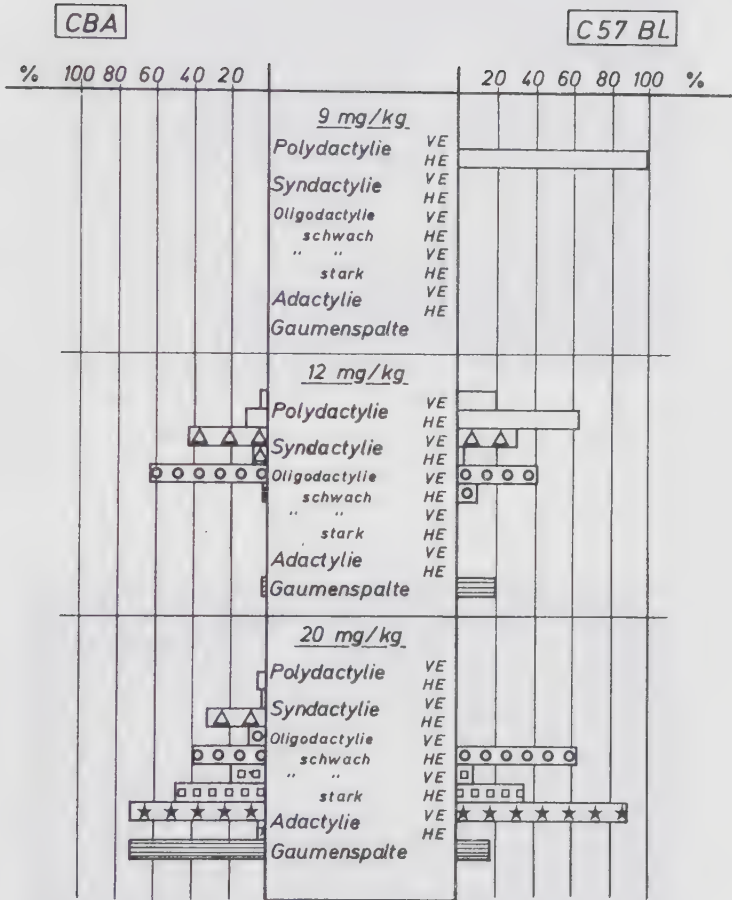


Abb. 19: Realisation verschiedener Mißbildungen nach Behandlung von Mäusen der Stämme CBA und C 57 BL am Tag 11 p. c. mit unterschiedlichen CPA-Dosen. Die Raten der Mißbildungsarten sind von der Zahl der mißgebildeten Feten und nicht von der Zahl der Implantate berechnet. Die dargestellten Werte sind in Tab. 8 aufgeführt.

Unterschiede zwischen den Stämmen CBA und C 57 BL

(s. a. Abb. 19 und Tab. 7, 8):

1. Das Fetengewicht nimmt bei beiden Stämmen mit steigender CPA-Dosis signifikant ab.
2. Die Mißbildungsrate bei 9 mg CPA/kg bzw. 12 mg CPA/kg ist bei C 57 BL höher als bei CBA.
3. Der Ausprägungsgrad der Mißbildungen ist nach Behandlung mit 12 mg CPA/kg bzw. 20 mg CPA/kg bei C 57 BL allgemein stärker als bei CBA.
4. Polydactylie tritt nach CPA-Behandlung bei C 57 BL wesentlich häufiger auf als bei CBA:

9 mg CPA/kg :	(HE): 100.0 % bei C 57 BL
	0.0 % bei CBA
12 mg CPA/kg:	(VE): 21.4 % bei C 57 BL
	4.5 % bei CBA
	(HE): 64.3 % bei C 57 BL
	11.3 % bei CBA
5. Nach Behandlung mit 20 mg CPA/kg tritt bei CBA an der Hinterextremität Syndactylie, bei C 57 BL nur Oligodactylie auf.
6. Gaumenspalten entstehen nach Behandlung mit 20 mg CPA/kg bei CBA in 71.1 %, bei C 57 BL nur in 18.2 % der Fälle.

Die Abb. 20 a - d zeigen exemplarisch typische Mißbildungen bei am Tag 16 lebend entnommenen Feten der Stämme C 57 BL und CBA verursacht durch einmalige Behandlung der Muttertiere mit 9, 12 oder 20 mg CPA/kg KG am Tag 11 p. c. .



Abb. 20 a: Stamm: C 57 BL; Dosis: 9 mg CPA/kg;
HE: Polydactylie (triphalanger 1. Strahl (3 statt 2 Glieder)). Das Tier
war sonst der äußeren Erscheinung nach normal entwickelt.



Abb. 20 b: Stamm: C 57 BL; Dosis: 12 mg CPA/kg;
reduz. Kiefer (Mikrognathie); reduz. äußeres Ohr; open-eye-lids; Schädel:
flach, leicht ödematös; Polydactylie: VE 7-, HE 6-strahlig.

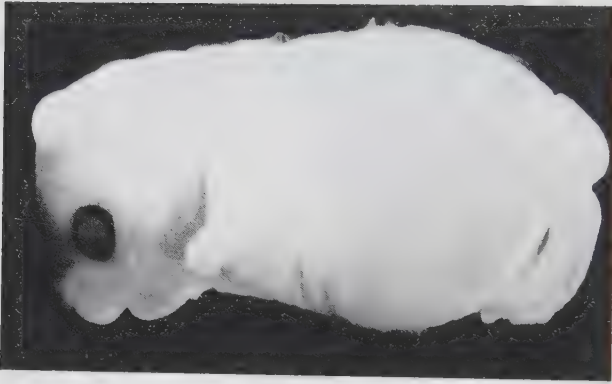


Abb. 20 c: Stamm: C 57 BL; Dosis: 20 mg CPA/kg;
reduz. Kiefer (Mikrognathie); kein äußeres Ohr; Schädel: verkleinert, 'open-
eye-lids'; VE: Adactylie, reduz. Zeugopodium; HE: starke Oligodactylie;
Kopf und Rumpf stark ödematös.

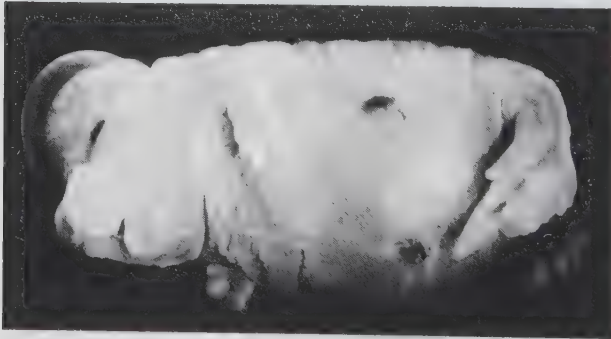


Abb. 20 d: Stamm: CBA; Dosis: 20 mg CPA/kg;
Kiefer leicht reduz.; kein äußeres Ohr; Schädel: keine S.knochen, massives
Ödem; Augen reduz.; VE: Oligodactylie, Zeugopodium stark reduz.; HE: Poly-
dactylie (6-str.), Zeugopodium leicht reduziert.; Rumpf leicht ödematös
'Monsterchen'

III.2.4. Pharmakokinetik und transplacenter Übergang

Beiden verwendeten Stämmen wurden am Tag 11 der Schwangerschaft 20 mg CPA/kg KG s. c. injiziert. Die Blutentnahme erfolgt 10, 30 und 45min nach Injektion. Die übrigen biol. Proben wurden 2 h nach Injektion entnommen.

Die Aufarbeitung der Proben für die Messung im GC-MS erfolgte wie unter II.8.-9. beschrieben.

Die Dosis von 20 mg CPA/kg KG wurde gewählt, um die Messungen in dem Konzentrationsbereich durchzuführen, in dem die in III.2.3. beschriebenen teratologischen Effekte auftraten. Die dabei erreichten Gewebekonzentrationen liegen zwar an der unteren Nachweisgrenze des verwendeten Meßverfahrens (30 ng/ml); höhere - somit besser und exakter meßbare - Konzentrationen hätten aber den entscheidenden Nachteil, daß sie weit außerhalb der biologisch nachweisbaren Effekte lägen, und eine Korrelation der Daten miteinander problematisch wäre.

Konzentrationen im Vollblut der Muttertiere (ug/ml): (Entnahme 10min. nach Injektion)

<u>Stamm</u>	<u>Tier</u>	<u>CPA</u>	<u>PAM</u>
		$\bar{x}$	$\bar{x}$
<u>C 57 BL</u>	I	3.6	1.4×10^{-2}
	III	5.1	5.3×10^{-2}
<u>CBA</u>	IV	5.8	4.1×10^{-2}
	V	4.6	2.0×10^{-2}
	VI	3.7	3.4×10^{-2}

Ein Konzentrationsunterschied im Blut der Muttertiere besteht demnach 10min nach Injektion von CPA zwischen den Stämmen CBA und C 57 BL weder für CPA noch für PAM.

Das Verhältnis CPA/PAM beträgt für CBA: 146/1 und für C 57 BL: 127/1. Diese Werte sind doppelt so hoch wie die im Plasma von NMRI-Mäusen (s. III.

1.4.(68/1)) gemessenen. Der Unterschied in den Konzentrationsverhältnissen zwischen den Stämmen CBA und C 57 BL ist geringfügig. Wegen der größeren Unsicherheit dieser Meßwerte - die gemessenen Konzentrationen lagen nahe der unteren Nachweisgrenze des Verfahrens - sind die Werte vorsichtig zu interpretieren. Es ist keine sichere Entscheidung zu treffen, ob kein Unterschied für das auftretende Verhältnis CPA/PAM zwischen den Stämmen vorliegt oder eine geringe Differenz tatsächlich vorhanden ist. Die Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen bei der CPA-Aktivierung von ca. 30 %, die sich aus den teratologischen- und Mutagenitätstests ergaben, liegen noch im Unsicherheitsbereich dieser Meßwerte.

Der Schluß, daß die PAM-Formation bei CBA und C 57 BL nur halb so hoch ist wie bei NMRI CPA/PAM: 146/1 bzw. 127/1 (CBA bzw. C 57 BL bei 20 mg CPA/kg) zu 68/1 (NMRI bei 120 mg CPA/kg) ist unter diesem Aspekt ebenfalls nur mit großen Vorbehalt zu betrachten.

Die Eichkurve für die PAM-Bestimmung im GC-MS-System ist in Abb. 4 gezeigt. Die Nachweisgrenze für PAM liegt mit dieser Methode bei 30 ng PAM/ml, g.

Eine Kinetikstudie erbrachte keinen Aufschluß über Unterschiede zwischen den beiden Stämmen CBA und C 57 BL. Die Gewebekonzentrationen von PAM und CPA lagen bei den Probeentnahmezeiten später als 10min nach Injektion unter der Nachweisgrenze der Methode.

Unterschiede im transplacentaren Übergang konnten aus dem gleichen Grund ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

IV. DISKUSSION

=====

IV.1. CPA und deuterierte Derivate

Der Einsatz stabiler Isotope, speziell deuterierter Derivate, zur Erforschung des Metabolismus von Substanzen ist eine relativ neue Technik. In der Pharmakologie/Toxikologie eröffnet die Verwendung von Derivaten, die mit stabilen Isotopen (z.B. ^{13}C , D) markiert sind, die Möglichkeit, die Wege einer Substanz - Metabolismus, Verteilung, Resorption, Exkretion - mit geringstem Zusatzrisiko für den Testorganismus/Probanden zu verfolgen. Die Identifikation der Substanzen erfolgt dort meist mit GC-MS-Methoden. Aufgrund ihrer Vorteile hat diese Technik in der Pharmakologie in kurzer Zeit an Bedeutung gewonnen und ist in viele Anwendungsbereiche eingeführt worden. Sie wurde, soweit bekannt, bisher noch nicht zur Untersuchung von Wirkungsmechanismen von teratogenen oder mutagenen Metaboliten angewandt. Die Praktikabilität in solchen Testsystemen sollte hier zusätzlich untersucht werden.

Die Methode hat bei der Aufklärung von Wirkmechanismen außer dem geringen Zusatzrisiko von weitere Vorteile gegenüber dem Einsatz radioaktiv oder durch Halogenierung/Alkylierung spezieller Positionen markierter Präparate. Es lassen sich durch Deuterierung ausgewählter Positionen im Molekül infolge der daraus resultierenden Veränderungen in Kinetik und Wirkungsgrad oder -spektrum der Substanz Metabolisierungswege spezifisch erfassen und verfolgen. Das Verfahren eignet sich besonders für die Erforschung indirekt wirkender Pharmaka, d.h., in ihrer Ausgangsform unwirksamer Substanzen, die der biologischen Aktivierung im Organismus bedürfen, um in den bzw. die wirksamen Metaboliten überführt zu werden.

Weitere Erwägungen über Vorteile des Einsatzes deuterierter Derivate gegenüber der Technik, metabolische Wege durch Anwendung halogenierter/alkylierter Derivate zu verfolgen, sind nachfolgend aufgeführt.

Bei enzymatischem Abbau bestehen wegen der veränderten Ladungsverteilung bzw. sterischen Struktur der Moleküle bei halogenierten/alkylierten Derivaten die Alternativen a) unveränderte Enzym-Substrat-Erkennung (E-S-E),

b) verbesserte E-S-E, c) verminderte E-S-E, d) Blockierung der E-S-E, Ablagerung/Ausscheidung der unveränderten Substanz, e) irreversible E-S-Bindung, evtl. erwünscht zur Identifikation des Enzyms, f) veränderte Metabolisierung über andere Wege wegen fehlender E-S-E des ursprünglichen Enzyms mit dem eingesetzten Derivat.

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Veränderungen und das Spektrum dieser Veränderungen im enzymatischen Metabolismus bei Verwendung derartig markierter Substanzen ist, wie man sieht, recht groß. Da zudem Kombinationen der angeführten Möglichkeiten simultan auftreten können, ist eine Interpretation oft schwierig und kann eher zu Fehlschlüssen führen. Da sich durch die Substitution von H gegen D Ladungsverteilung und Struktur eines Moleküls nicht grundlegend verändern, ist die E-S-E kaum beeinträchtigt. Enzymatische Reaktionen an der deuterierten Position laufen allenfalls verlangsamt ab. Das gleiche gilt auch für nicht enzymatisch katalysierte Reaktionen. Die Gefahr von Fehlergebnissen oder -interpretationen aus den o.a. Gründen ist bei deuterierten Derivaten also deutlich geringer, da nur die Möglichkeit besteht, im ursprünglichen Stoffwechselweg Reaktionen zu verlangsamen. Die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Weg verändert oder verlassen wird, ist dagegen als sehr gering einzuschätzen. Eine Ausnahme kann hierbei das Einsetzen eines 'metabolic - switching'-Prozesses darstellen.

Dieser Vorgang tritt dann ein, wenn zwei gleichberechtigte metabolische Wege für den Abbau einer Substanz existieren. Wird einer der Wege behindert oder blockiert, so läuft der Abbau automatisch über einen der anderen Wege ab. Das Endprodukt wird weiterhin produziert, oft mit kaum meßbaren Veränderungen in der Kinetik der Gesamtreaktion vom Ausgangssubstrat zum Endprodukt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß aufgrund anderer Reaktionsmechanismen als im Ursprungsweg völlig andere Endprodukte entstehen. Die energetischen Verhältnisse in den jeweilig auftretenden Metaboliten können durchaus mehrere Reaktionsmechanismen zulassen. Das tatsächliche Reaktionsverhalten wird dann jeweils von momentanen Parametern wie pH, Substrat-, Enzymkonzentrationen und -konfigurationen, Ionenkonzentrationen Energieangebot u.a.m. bestimmt. Ein Isotopeffekt wäre im ersten Fall (gleiches Endprodukt) kaum, im zweiten Fall (verändertes Endprodukt) wahrschein-

lich nachweisbar. Die Lokalisierung der entsprechenden Reaktion ist in diesen Fällen aber recht schwierig, da sämtliche auftretenden Metaboliten erfaßt und die angesprochenen Veränderungen detektiert werden müssen. Das Problem tritt selbstverständlich bei Einsatz halogenierter/alkylierter Derivate gleichermaßen auf. Zur Abklärung der Frage nach dem/den originären Stoffwechselweg(en) wäre dann eine Analyse der jeweiligen metabolischen Wege durch Einsatz radioaktiv markierter 'Original-Präparate' notwendig.

Zur Deuterierung von organischen Molekülen sowie den daraus resultierenden Konsequenzen sollen hier einige grundsätzliche Bemerkungen eingeschoben werden. Der Austausch eines Protons gegen ein Deuteron in einem Molekül hat Auswirkungen auf die chem., phys.-chem. und physikalischen Eigenschaften des Moleküls. Die C-D-Bindung weist gegenüber der C-H-Bindung einige Unterschiede auf:

1. sterisch: Die C-D-Bindungslänge ist kürzer als die C-H-Bindungslänge (entsprechendes gilt für O-D-/O-H-Bindungen);
2. energetisch: Die Bindungsenergie der C-D-Bindung liegt bei einer Reihe von Substanzen um 1.6 kcal/mol höher als die der korrespondierenden C-H-Bindung;
3. induktiver Effekt: Die C-D-Bindung ist polarer als die C-H-Bindung; die induktive Elektronenfreisetzung aus einer C-D-Bindung ist effektiver als aus einer C-H-Bindung;
4. Hyperkonjugativer Effekt: Die C-D-Bindung ist geringer polarisierbar als die C-H-Bindung.

Wegen der Bedeutung des letztgenannten Effekts für den Reaktionsmechanismus bei CPA soll näher darauf eingegangen werden.

Die Hyperkonjugation - auch Baker-Nathan-Effekt - ist ein der Mesomerie ähnlicher Resonanzeffekt zwischen den Elektronen einer C-C-Mehrfachbindung und denen der C-H-Bindungen benachbarter Methyl(CH₃)- oder Methylen(CH₂)-Gruppen. D.h., wenn eine Methylgruppe mit einem ungesättigtem System ver-

bunden ist, überlagert sich dem normalen tetraedrischen Valenzzustand des C-Atoms und den s-Orbitalen der H-Valenzelektronen ein Zustand, der das C-Atom in einen di- oder trigonalen Valenzzustand mit ein oder zwei Elektronen und die drei H-Atome in Valenzzustände mit Gruppeneigenfunktionen, die Symmetrieeigenschaften von zwei π -Elektronen und einem σ -Elektron zeigen, überführt. Es entsteht dadurch ein 'Quasi-H₃-Atom', das über eine scheinbare Dreifachbindung (C $\equiv$ H₃) an das C-Atom gebunden ist. Die Hyperkonjugation tritt nun als Resonanzeffekt zwischen dieser Quasi- und der echten Doppel- oder Dreifachbindung auf. Da der sp²- oder sp-Valenzzustand bei der Methylgruppe nur schwach ausgeprägt ist, die 'Quasi- π -Elektronen' also erheblich fester an die Atomkerne gebunden sind als echte π -Elektronen, ist der energetische Effekt erheblich geringer als bei einer Mesomerie. Unter anderem ist eine Verkürzung der C-C-Bindungslänge die Folge, wenn sie auch geringer ausfällt als bei echter Mesomerie (z.B. C₂H₅ : 1.54 Å ; CH₃-CH=O : 1.50 Å ; C₆H₆ : 1.39 Å). Die physik., physik.-chem. und reaktiven Eigenschaften des Moleküls sind durch die Hyperkonjugation aber sehr wohl beeinflusst (s. a. Brockhaus, 1971; Thomas, 1972).

Durch die Deuterierung verringert sich also die Reaktivität am deuterierten Atom, da hyperkonjugative Resonanzeffekte stark vermindert werden (Isotopeneffekt 1. Grades).

Gleichzeitig wird durch die Deuterierung die Reaktionsbereitschaft an benachbarten Atomen beeinflusst (Isotopeneffekt 2. Grades). Wegen der geringen Hyperkonjugation, d.h., einer stärkeren Lokalisierung der Bindungselektronen, nimmt die Reaktionsbereitschaft auch dieser Atome ab. Ebenso werden auf Resonanzeffekten beruhende Umlagerungen und Spaltungen im Molekül erschwert. Derartige Reaktionen laufen verlangsamt ab, im Extremfall werden sie verhindert.

Soweit die bisher erwähnten aus der Deuterierung resultierenden Effekte zu einer Veränderung der Reaktivität oder der Reaktionskinetik des markierten Moleküls führen, spricht man von einem primären Isotopeneffekt.

Als sekundäre Isotopeneffekte werden alle Veränderungen in Reaktionsabläufen und -kinetiken bezeichnet, die durch markierte Moleküle hervorgerufen werden, die nicht primäre Reaktionspartner in der zu untersuchenden Reaktion

sind (z.B. markierte Lösungsmittel).

Zu den sekundären Isotopeffekten zählt in erster Linie der stärker nucleophile Charakter deuterierter Ionen gegenüber ihren protonierten Analogen. So ist bekannt, daß das Deuteroxid-Ion in D_2O stärker nucleophil ist als das Hydroxid-Ion in H_2O ($pD = pH + 0.40$). Das Methoxid-Ion in Methanol- d ist sogar über 50 % stärker nucleophil als in Methanol. Diese sekundären Isotopeffekte können z.B. im Falle von D_2O als Lösungsmittel über solvolytische Mechanismen Reaktionen nicht markierter Reaktionspartner entscheidend beeinflussen. Unter Umständen wird das Lösungsmittel dann zum Reaktionspartner (s.a. Thomas, 1972).

Bei den hier eingesetzten deuterierten Derivaten von CPA sind ausschließlich primäre Isotopeffekte 1.- oder 2.- Grades zu erwarten. Enzymatisch katalysierte Reaktionen an der deuterierten Position dürften aufgrund der höheren Bindungsenergie der C-D-Bindung verlangsamt ablaufen. Die enzymatische Aktivierungsenergie ist aber allgemein ausreichend, um die Reaktionen weiterhin zu katalysieren. - Das Enzym wird als Reaktionsbeschleuniger und Vermittler spezifischer Reaktionen angesehen. Diese chemischen Reaktionen würden ohne enzymatische Katalyse extrem langsam und nicht mit der für enzymatische Reaktionen charakteristischen hohen Spezifität ablaufen. - Spontane Umlagerungen im Molekül z.B. zur Resonanzstabilisierung können demgegenüber stärker von der Deuterierung betroffen sein. Voraussetzung für deutlich sichtbare Effekte ist aber in beiden Fällen, daß es sich um geschwindigkeitsbestimmende Schritte im Reaktionsablauf handelt.

Im Falle von CPA wären die primäre Hydroxilierung sowie die Resonanzstabilisierung, durch Abspaltung von Acrolein (β -Eliminierung) aus dem - aufgrund der ungünstigen energetischen Verhältnisse - instabilen tautomeren Paar 4-OH-CPA/Aldo-PA, als potentiell geschwindigkeitsbestimmende Schritte prädestiniert für die Ausbildung von Isotopeffekten infolge von Deuterierung.

Nachdem die Synthese deuterierter Derivate von CPA gelungen war ($4'4\text{-}d_2$ -; $5'5\text{-}d_2$ -; $4'4\text{-}6'6\text{-}d_4$ -CPA)(Cox et al., 1976 a), hatte die gleiche Gruppe nachgewiesen (1976 a), daß Isotopeffekte von 1.8 bzw. 2.2 in der Bildung von Carboxy-PA bzw. 4-keto-CPA bei $4'4\text{-}d_2$ - bzw. $4'4\text{-}6'6\text{-}d_4$ -CPA auftraten, aber keine Veränderungen der oncostatischen Aktivität gegenüber einem

ADJ/PC6-Maus-Plasmazell-Tumor. Allein für 5'5-d₂-CPA war eine deutliche Verminderung der oncostatischen Aktivität nachweisbar (Isotopeffekt 7-13), der - sehr wahrscheinlich wegen der Deuterierung an C-5 - mit einer Verringerung der Formierung von PAM und Acrolein gekoppelt war (Isotopeffekt 5.3)(s. Abb. 19).

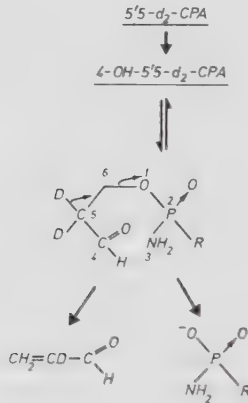


Abb. 19: CPA-Metabolisierung unter Berücksichtigung der Spaltung einer C-D-Bindung bei 5'5-d₂-CPA, die als Isotopeffekt nachweisbar ist (nach Cox et al., 1976, a).

Es wurde daher die Vermutung aufgestellt, daß der entscheidende Schritt in der Aktivierung der oncostatischen Eigenschaften von CPA die Spaltung von Aldo-PA in PAM und Acrolein ist (β -Eliminierung)(s. Cox et al., 1976a).

Nachweislich wird CPA im Organismus sehr schnell in 4-OH-CPA/Aldo-PA umgesetzt (Connors et al., 1974; Wagner et al., 1977). Die hohe oncostatische Spezifität von CPA - gemessen an der Wirkung auf einen Yoshida-Ascites-Tumor bei Ratten - ist nach Untersuchungen von Brock, 1976; Brock, Hohorst, 1977; Hohorst et al., 1976 ausschließlich an die Anwesenheit von 4-OH-CPA gekoppelt. Sie geht nach Angaben dieser Autoren nach der β -Eliminierung von Acrolein verloren.

Die unter III.1.1.-III.1.4. dargestellten Resultate belegen deutlich die zentrale Rolle der eben angeführten Spaltung von 4-OH-CPA/Aldo-PA in PAM/Acrolein. Die dort beschriebenen umfangreichen Untersuchungen zielten neben der Untersuchung der Anwendbarkeit deuterierter Derivate in diesen Testsystemen primär auf die Entscheidung der Frage, welcher Schritt in der CPA-Aktivierung als der geschwindigkeitsbestimmende angesehen werden muß.

Zwei zentrale Reaktionen stehen dabei zur Debatte:

1. die Hydroxylierung von CPA am C-4 des Oxazaphosphorinringes durch das P-450/448 mischfunktionelle Oxidasensystem als primäre Reaktion im CPA-Metabolismus in vivo überhaupt;
2. die Abspaltung von Acrolein (β -Eliminierung) durch Lösen der Bindung zwischen C-6 und O-1.

Faßt man die mit den 3 deuterierten Derivaten von CPA (4'-4-d₂-; 5'-5-d₂-; 4'-4-6'-6-d₄-CPA) in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zusammen, lassen sich folgende Punkte festhalten:

1. CPA, 4'-4-d₂-, 4'-4-6'-6-d₄-CPA unterscheiden sich bei in vitro Metabolisierung nicht in ihrer mutagenen Aktivität zur Auslösung von Punktmutationen (base-pair-substitutions) bei *Salmonella typhimurium*. Allein 5'-5-d₂-CPA zeigt einen deutlichen Isotopeneffekt (1.7 bei $6. \times 10^{-4}$ M CPA und 5'-5-d₂-CPA);
2. 5'-5-d₂-CPA zeigt einen deutlichen Isotopeneffekt gegenüber CPA nach in vitro Metabolisierung in der Induzierung von SCEs (1.7 bei 1.35×10^{-4} M CPA und 5'-5-d₂-CPA) und Chromosomenaberrationen (Brüche 3.3, Austausch 12.3 je bei 1.35×10^{-4} M CPA und 5'-5-d₂-CPA) in CHO-Zellen;
3. CPA, 4'-4-d₂-, 4'-4-6'-6-d₄-CPA unterscheiden sich in vivo nicht in der Induzierung teratogener Schäden bei NMRI-Mäusen bei Applikation am Tag 11 p. c.. 5'-5-d₂-CPA zeigt einen deutlichen Isotopeneffekt (2.5);
4. Die PAM-Formation in vivo (β -Eliminierung) in Maus-Plasma und Embryonen

von NMRI-Mäusen ist bei 5'5-d₂-CPA vermindert (Isotopeneffekt 3.2 bzw. 2.2).

5. CPA, 4'4-d₂- und 5'5-d₂-CPA unterscheiden sich in vivo in einem weiten Dosisbereich nicht wesentlich in der Pharmakokinetik. Der transplacentare Übergang ist für alle Substanzen identisch.

Im Dosisbereich ≥ 80 mg/kg erreicht 5'5-d₂-CPA eine geringfügig höhere max. Gewebekonzentration als 4'4-d₂-CPA und CPA. Durch schnellere Elimination von 5'5-d₂-CPA kehrt sich dieses Verhältnis ca. 25min nach Injektion um.

Aus der Zusammenfassung der Resultate lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Das in seiner Ausgangsform unwirksame CPA wird über einen metabolischen Weg zu mutagenen, teratogenen und auch zu oncostatischen (Cox et al., 1976a) Metaboliten toxifiziert, in dem die Spaltung der C-H bzw. C-D-Bindung an C-5 eine entscheidende Rolle spielt.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist nicht die primäre Hydroxilierung an C-4 (Connors et al., 1974) (die Deuterierung an C-4 hat keinerlei Einfluß auf mutagene, teratogene und spezifische oncostatische Eigenschaften; allein die Bildung von 4-keto-CPA und Carboxy-PA ist vermindert (Isotopeneffekte 2.2 bzw. 1.8) (Cox et al., 1976 a)), sondern die β -Eliminierung (Formation von PAM/Acrolein aus 4-OH-CPA/Aldo-PA unter Abspaltung eines H- bzw. D-Atoms von C-5).

Nach Connors et al. (1974), der umfangreiche in vitro Untersuchungen mit 4'4-d₂-CPA zum Metabolismus von CPA durchführte, findet die primäre Hydroxilierung von CPA mit 10 : 1 bevorzugt an C-4 gegenüber C-6 statt. Obwohl C-6-Hydroxy-CPA bisher nicht aus biologischen Proben nachgewiesen werden konnte, ist nicht auszuschließen, daß auch in vivo geringe Anteile an 6-OH-CPA produziert werden. Der Grund für die strikte Bevorzugung der C-4-Position bei der Hydroxilierung ist unklar, er mag sich aus den Eigenschaften des beteiligten Enzymsystems herleiten.

Diese Schlüsse sind statthaft, da wie o.a. die Gewebekonzentrationen und transplacentaren Übergänge bei allen getesteten Substanzen identisch, die

Gewebskonzentrationen von 5'5-d₂-CPA teilweise sogar noch höher lagen als die der übrigen Substanzen.

Während frühere in vitro Experimente von Cox et al. (1976 a) mit 5'5-d₂-CPA, bei denen die Formation von Acrolein und damit indirekt von PAM bei Metabolisierung mit Rattenlebermikrosomen bestimmt und ein Isotopeneffekt von 5.3. ermittelt wurde, wurden bei den hier vorgenommenen direkten Messungen der PAM-Formation in vivo in Maus-Plasma und Embryonalgewebe Isotopeneffekte von 3.2 bzw. 2.1 nachgewiesen.

Die HWZ von CPA, 4'4-d₂-CPA und 5'5-d₂-CPA in Blut betrug bei allen 3 verwendeten Konzentrationen (20, 40, 80 mg/kg) ca. 10min. In den übrigen Geweben lagen die Werte etwas darüber (11-14 min).

Die gegenüber CPA und 4'4-d₂-CPA leicht veränderte Kinetik von 5'5-d₂-CPA bei Dosen ≥ 80 mg/kg ist schwer zu interpretieren. Es ist müßig, hier diesen Effekt eingehend zu diskutieren. Die verwendeten Konzentrationen liegen weit oberhalb derer, für die biologische (z.B. therapeutische, teratogene) Effekte nachweisbar sind. Zudem sind für eine differenziertere Auswertung die Daten wegen der geringen Versuchstierzahlen nicht ausreichend sicher. Die unterschiedlichen Isotopeneffekte für SCEs und strukturelle Chromosomenaberrationen (1.7 und 3.3 bzw. 12.3) können weder durch Verwendung verschiedener experimenteller Bedingungen noch unterschiedlicher Zellpopulationen erklärt werden. Die zur cytologischen Analyse verwendete Technik - entwickelt von Vogel und Natarajan (1981) - läßt eine gleichzeitige Analyse von SCEs und Chromosomenaberrationen aus der gleichen Zellpopulation zu. Dazu wird während des 1. Zellzyklus in der chromosomalen DNA Thymin (T) gegen 5-Bromuracil (B) ausgetauscht. In der Konstellation TB-TB erfolgt die Behandlung mit dem zu testenden Agens: Ein weiterer Zellzyklus, der zur Konstellation TB-TT führt, die differentiell angefärbt werden kann, schließt sich an.

Ohne in vitro Metabolisierung mit S9-Mix hat weder 5'5-d₂-CPA noch CPA einen Effekt auf die Chromosomen (s. Kontrollwerte). Resultate von Waalkens et al. (1981), die SCE-induzierende Aktivität von CPA in Lymphocyten von Mensch, Ratte und Kaninchen in einer 48h-Langzeitbehandlung beschrieben, mögen auf einen geringen spontanen Zerfall von CPA unter den gewählten experimentellen Bedingungen bzw. auf metabolische Aktivitäten der Zellen selbst infolge

eines geringen Cytochrom-P450 Gehaltes zurückzuführen sein. Die hier gezeigten Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denen anderer Autoren, nachdem CPA nur nach metabolischer Aktivierung genetische Effekte induziert.

Das einzige deuterierte Derivat von CPA, das deutliche Isotopeneffekte zeigt, ist 5'5-d₂-CPA. Es ist weniger mutagen in vitro gemessen an der Induzierung von Punkt-, Chromatid- und Chromosomenmutationen, weniger teratogen in vivo, sowie nach Cox et al. (1976 a) geringer oncostatisch in vivo.

Nach den pharmakokinetischen Studien ist nicht 5'5-d₂-CPA selbst für die Effekte verantwortlich, da es sich identisch zu CPA und den anderen deuterierten Derivaten verhält und eher noch in höheren Gewebskonzentrationen auftritt als diese.

Das tautomere Paar 4-OH-CPA/Aldo-PA scheidet ebenfalls als verantwortlicher Metabolit aus, da nach den vorliegenden Ergebnissen und den Untersuchungen von Connors et al. (1974) die Umsatzrate der enzymatischen 4-Hydroxylierung durch Deuterierung an C-4 nur sehr geringfügig beeinflußt wird. Damit kann diese Reaktion auch nicht als geschwindigkeits-determinierender Schritt angesehen werden. Die Deuterierung an C-5 dürfte auf die 4-Hydroxylierung keinen Einfluß haben. Dagegen müßte wegen der verlangsamten Spaltung von Aldo-PA in PAM/Acrolein infolge der Deuterierung an C-5 sogar über längere Zeit eine höhere Gewebskonzentration an 4-OH-5'5-d₂-CPA/Aldo-5'5-d₂-CPA bestehen als korrespondierend an 4-OH-CPA/Aldo-PA nach Verabreichung von CPA.

Der deutliche Isotopeneffekt bei der Spaltung von Aldo-PA in PAM/Acrolein durch die Deuterierung an C-5 gegenüber dem geringen Effekt einer Deuterierung an C-4 auf die dortige - eindeutig nachgewiesene - enzymatische Hydroxylierung (s. Hales, Jain, 1980) belegt eindeutig, daß die β -Eliminierung von Acrolein den geschwindigkeits-determinierenden Schritt in der CPA-Aktivierung darstellt, ohne allerdings Aufschluß darüber zu geben, ob es sich dabei um eine spontane oder enzymatisch katalysierte Reaktion handelt.

Auf alle Fälle ist der metabolische Weg der von 4-OH-CPA/Aldo-PA zu PAM/

Acrolein führt, von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung aller - mutagener, teratogener und oncostatischer - Eigenschaften von CPA. D.h., daß das Paar PAM/Acrolein bzw. dessen Folgeprodukte favorisiert als Träger der gesamten Eigenschaften von CPA angesehen werden müssen. Die mutagenen Eigenschaften dürften dabei PAM als starkem direkt alkylierendem Agens zugeschrieben werden. Für die Teratogenität von CPA ist nach neuesten Befunden von Hales (1982) Acrolein als hauptverantwortlicher Metabolit anzusehen. Da alkylierende Substanzen allgemein oncostatische Eigenschaften zeigen - schnell proliferierende Zellsysteme sind sensibel gegenüber Alkylierung der DNA - wären PAM oder dessen Folgeprodukte auch Hauptkandidaten für diesen Wirkungsbereich von CPA.

Die oncostatische Spezifität scheint an das Paar 4-OH-CPA/Aldo-PA gekoppelt zu sein, da die direkt alkylierende Substanz PAM keine Permeationsfähigkeit in Tumorzellen besitzt (Lenssen et al., 1979).

Mit diesen Untersuchungen konnte gleichzeitig gezeigt werden, daß der Einsatz stabiler Isotope (hier: deuterierter Derivate) zur Erforschung verantwortlicher Metabolite für mutagene als auch teratogene Eigenschaften in vivo wie in vitro gleichermaßen möglich und sogar hervorragend geeignet ist.

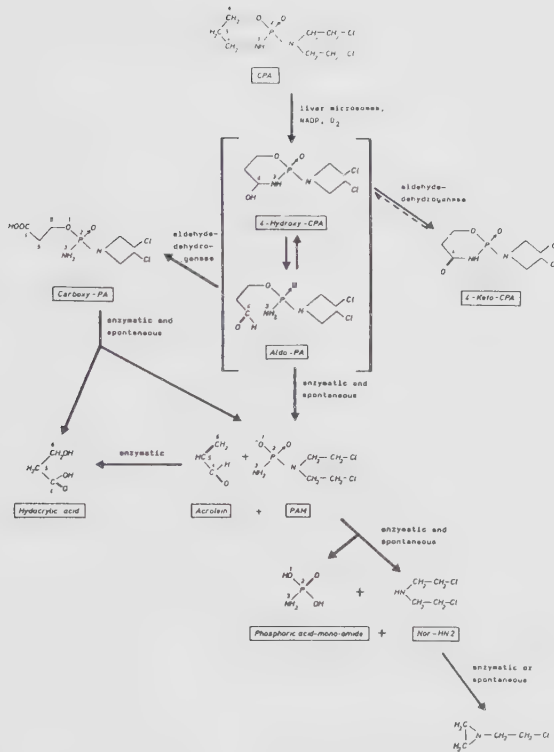
IV.2. CPA und Metabolite

Ein möglichst umfassender Vergleich der Eigenschaften aller bekannten Metaboliten des zentralen Stoffwechsels von CPA in in vivo und in vitro Experimenten, bisher - soweit bekannt - noch nicht durchgeführt, erscheint als eine weitere sinnvolle und notwendige Ergänzung bei der Aufklärung des Wirkmechanismus von CPA und speziell der Einkreisung der/des wirksamen Metaboliten.

Untersucht wurden die mutationsinduzierenden Potentiale der Metaboliten in vitro an der Induktion von Punktmutationen (base-pair-substitutions) in Bakterien (*Salmonella typh.*, Ames-Test, Standardverfahren) sowie an der Induktion von Sister-Chromatid-Exchanges (SCEs) in menschlichen Lymphocyten. Im Fall des Bakterientestverfahrens wurden die Einflüsse unterschiedlicher in vitro Metabolisierungssysteme (Einsatz von Rattenleber-S9 aus verschiedenen vorinduzierten Tieren) auf die Mutagenität der Substanzen zusätzlich untersucht. Diese Resultate werden im Teil 2.a. 'Aktivierung mit Ratten-S9' diskutiert.

Der Teil 2.b. 'Aktivierung mit Maus-S9' behandelt Ergebnisse, die bei in vivo und in vitro Experimenten an zwei Inzucht-Mäusestämmen (CBA und C 57 BL) gewonnen wurden. Von diesen Mäusestämmen war bekannt, daß sie auf CPA teratologisch quantitativ und qualitativ unterschiedlich reagieren (s. III. 2.3. und pers. Mitteilung von Frau Dr. U. Kocher-Becker, Inst. f. Toxikologie, FU-Berlin). Geprüft wurden hier in vitro die aktivierenden Eigenschaften von S9-Fractionen aus Leber und Nieren dieser Stämme - den zentralen Organen für die CPA-Aktivierung (Hales, Jain, 1980 b) - für CPA und Metabolite, gemessen an der Induktion von Punktmutationen in *Salmonella typh.* In vivo wurden Messungen der Pharmakokinetik und des transplacentaren Übergangs vorgenommen.

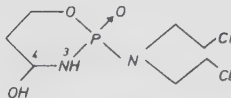
Zur Einleitung eine kurze Zusammenstellung von bisher bekannten Fakten zu den hier untersuchten Metaboliten:



Zentraler Metabolismus von CPA

'Aktiviertes CPA'

4-OH-CPA:



Instabiler 1. Metabolit von CPA mit noch geschlossenem Oxazaphosphorinring. Bildung durch Hydroxilierung an C-4 von CPA über das Cytochrom P-450 mischfunktionelle Oxidase System (molekularer Mechanismus bisher unklar). Entsteht im wässrigen Milieu spontan aus dem stabil lagerbaren 4-OH-peroxy-CPA

(s. Abb. 21).

In bakteriologischen und cytologischen Tests ist 4-OH-CPA hoch mutagen und cytotoxisch (s. a. Hales, 1983). Nach Hales (1983) auch hoch teratogen für Ratten am Tag 13 p. c.

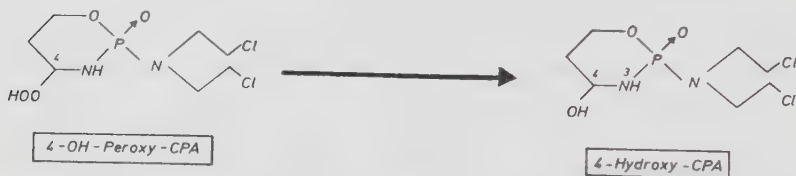
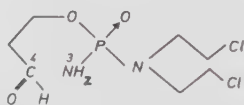


Abb. 21: Spontane Reaktion von 4-OH-Peroxy-CPA in wäss. Milieu

Aldo-PA:



Ringoffener tautomerer Partner von 4-OH-CPA. Das Paar 4-OH-CPA/Aldo-PA gilt als Träger der oncostatischen Spezifität von CPA (Brock, 1976; Brock, Hohorst, 1977; Hohorst et al., 1976).

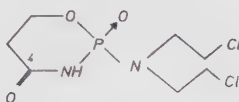
Der qualitative und quantitative Nachweis erfolgt als 4-benzylmercapto-CPA über Dünnschichtchromatografie (Methode s. Wagner et al., 1977 b). Weitere quantitative Nachweismethoden für das Paar Aldo-PA/4-OH-CPA beschreiben G. Zon et al. (1982) und Voelcker et al. (1979). Beim ersten Verfahren wird Aldo-PA quantitativ mit O-methylhydroxylamin in ein stabiles O-methyloxim umgesetzt und im GC-MS gemessen. Das zweite Verfahren mißt fluorimetrisch die Bildung von 4-OH-chinolin aus der Kondensation von quantitativ aus 4-OH-CPA/Aldo-PA freigesetztem Acrolein mit m-Aminophenol.

Halbwertszeiten (HWZ): In vitro werden sowohl 20 bzw. 80min für 4-OH-CPA bzw. Aldo-PA in Phosphatpuffer, pH 7.2 (Voelcker et al., 1974), als auch 18h für 4-OH-CPA in tris.-HCl pH 7.4 (Cox et al., 1976 b) angegeben. Letztere lange HWZ dürfte sich durch die Stabilisierung von 4-OH-CPA durch das tris-(OH-methyl)-methylammonium-Ion ergeben. D.h., in vitro Messungen der HWZ geben im Falle der CPA-Metaboliten keinerlei Aufschluß über die Si-

tuation in vivo. Von Powers et al. (1983) wird eine Plasma-HWZ von 30min für 4-OH-CPA bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten genannt.

'Deaktiviertes CPA'

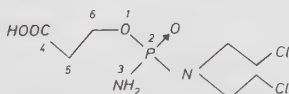
4-keto-CPA:



Biologisch relativ inaktiver Metabolit von CPA. Entsteht durch enzymatische Oxidation von 4-OH-CPA mittels einer Aldehyd-Dehydrogenase (ADH). Nachweisbar in Blut und Urin nach CPA-Applikationen. Im Urin von Mäusen ist 4-keto-CPA nach Untersuchungen von Suling et al. (1978) neben CPA und Nor-HN2 das Hauptausscheidungsprodukt. Die relative Konzentration von 4-keto-CPA und Nor-HN2 im Urin steigt mit der Zeit, während die ausgeschiedene CPA-Konzentration parallel dazu sinkt.

HWZ: Im Maus-Plasma (männl. BDF₁-Maus) ca. 34min (Suling et al., 1978).

Carboxy-PA:



Die Stellung dieses Metaboliten in der Wirkungskette von CPA ist umstritten. Die Bildung erfolgt enzymatisch durch Oxidation von Aldo-PA. Eine Inhibition der NAD⁺-abhängigen Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) mit Disulfiram führt zu verminderter Carboxy-PA-Produktion; Disulfiram Vorbehandlung führt bei in vivo Experimenten übrigens auch zu einem Absinken des therapeutischen Indexes (LD 50/ED 90; LD = letale Dosis, ED = effektive Dosis) von CPA von 93 auf 63 (Cox et al., 1976 b). Nach Untersuchungen von Domeyer und Sladek (1980) kann es inzwischen als sicher angesehen werden, daß die Produktion von Car-

boxy-PA nicht durch eine Aldehydoxidase (ADO) - wie bisher allgemein angenommen - sondern überwiegend durch eine Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) - wie auch 4-keto-CPA - katalysiert wird.

Deuterierung an C-4 bewirkt zwar auch einen Isotopeneffekt von 1.8 bei der Carboxy-PA-Produktion, hat aber keinen Einfluß auf den therapeutischen Index von CPA in vivo. 4-methyl-CPA dagegen, bei dem die sekundäre Oxidation von Aldo-PA zu Carboxy-PA blockiert ist, hat bei in vivo Tests nur den therapeutischen Index von PAM (4-methyl-CPA: TI = 54; PAM: TI = 50) (Cox et al., 1976 b). Der Effekt der Deuterierung an C-4 auf die Oxidation von Aldo-PA zu Carboxy-PA ist wahrscheinlich zu gering, um deutlich sichtbare biologische Auswirkungen hervorzurufen.

Die Selektivität von CPA wird demnach entscheidend nicht nur von der Existenz des Paares 4-OH-CPA/Aldo-PA, sondern auch vom Potential zur Oxidation an C-4 von Aldo-PA zu Carboxy-PA bestimmt. Wird diese Reaktion behindert oder blockiert, sinkt die oncostatische Selektivität entscheidend, während die alkylierenden Eigenschaften erhalten bleiben (sie entsprechen denen von PAM).

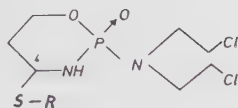
Die cytotoxischen Eigenschaften gegenüber schnell proliferierenden Zellsystemen liegen deutlich unter denen von 4-OH-CPA und PAM (Brock, Hohorst, 1977; Cox et al., 1976 b).

Lenssen und Hohorst (1979) äußern die Ansicht, daß die geringere Cytotoxizität von Carboxy-PA aus dem anionischen Charakter dieses Metaboliten herzu-leiten ist. Es würde danach nur Absorption an der Zelloberfläche stattfinden, aber kein Übergang in das Cytoplasma.

Carboxy-PA erweist sich in bakteriologischen und cytologischen Testsystemen als deutlich mutagener und toxischer als 4-keto-CPA, vermutlich infolge Spaltung in PAM und Hydacrylsäure. Letztere Reaktion läuft sehr wahrscheinlich sowohl spontan als auch enzymatisch katalysiert ab (s.u.). Im Urin CPA-behandelter Mäuse wird Carboxy-PA in geringen Mengen nachgewiesen (Suling et al., 1978).

Der Nachweis von 4-keto-CPA und Carboxy-PA erfolgt nach Vorreinigung über Ionenaustausch-Säulenchromatografie entweder mit Dünnschichtchromatografie (TLC) (Sladek, 1973) oder im GC-MS (Struck et al., 1971).

4-(SR)-mercapto-CPA:

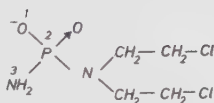


Gruppe von reversibel deaktivierten CPA-Verbindungen, die durch Reaktion von 4-OH-CPA mit freien oder proteingebundenen Thiol-(SH-)Gruppen (s. Brock, Hohorst, 1977; Hales, 1981) entsteht.

'Toxifiziertes CPA'

PAM:

(Phosphoramid
Mustard)



Bildung durch spontane und katalysierte Spaltung von 4-OH-CPA/Aldo-PA in PAM und Acrolein (Brock, Hohorst, 1977 (Übersicht); Low et al., 1982; Powers, Sladek, 1983). Enzymatische Katalyse kann nicht ausgeschlossen werden (s.u.).

Stark alkylierendes Agens, hoch mutagen. PAM gehört zur Gruppe der N-Loste. Es alkyliert unter physiologischen Bedingungen unter Bildung eines Aziridinium-Ion Zwischenproduktes (Colvin et al., 1976; Fenselau, 1976) (s. Abb.22). PAM ist nach Gabe von CPA in Blut und Gewebe nachweisbar (Fenselau et al., 1975; Jardine et al., 1976). Als Träger der oncostatischen Eigenschaften von CPA wird PAM von Colvin et al. (1976), Connors et al. (1974), Fenselau et al., (1975) und Struck et al. (1975) favorisiert. Die cytotoxische Aktivität und der therapeutische Index von PAM sind gegenüber CPA und 4-OH-CPA vermindert (Cyt. Akt.: 7.5 CU/uMol gegen 0 bzw. 63 CU/uMol; TI: 50 gegen 93 bzw. (nicht genannt) (nach Cox et al., 1976 b)). Nach Lenssen und Hohorst (1979) könnte eine Ursache die kaum meßbare Aufnahme von PAM in Tumorzellen sein (gemessen in vitro an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen),

die mit dem anionischen Charakter des Moleküls begründet wird. Die vorteilhafteste qualitative und quantitative Nachweismethode für PAM stellt z. Zt. das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren dar, da hier PAM und CPA aus der gleichen biologischen Probe bestimmt werden.

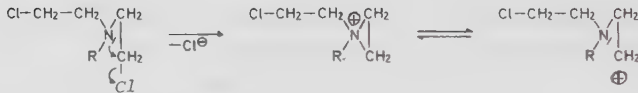
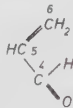


Abb. 22: Alkylierungsmechanismus von Stickstoffloten. Nach Chloridabspaltung kommt es zur Ausbildung eines Aziridinium-Ions (Äthyleniminring). Die Cl^- -Abspaltung und Reaktionsfähigkeit der Verbindung werden durch den Rest = R beeinflusst (R = CH_3 : Chlormethin, Stickstoff-Lost; R = H : Nor Nitrogen Mustard (Nor-HN2))(s.a. Colvin et al., 1976).

Acrolein:



Entstehung äquimolar mit PAM bei der Spaltung von Aldo-PA. Sehr reaktives Aldehyd mit stark cytotoxischen aber nur begrenzten mutagenen und teratogenen Eigenschaften. Es ist sehr wahrscheinlich für die nach höheren CPA-Dosen meßbare Denaturierung des Cytochrom P-450-Komplexes verantwortlich (Marinello et al., 1978).

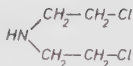
Acrolein ist nur in einem sehr eng begrenzten Konzentrationsbereich wirksam (Hales, 1982; Lijinsky, Andrews, 1980; Low et al., 1982; s.u.).

Die Rolle von Acrolein in der Wirkungskette von CPA ist noch unklar.

Als ursächlicher Auslöser der hämorrhagischen Zystitis der Blase, die bei CPA-Therapie als Nebenwirkung auftritt, konnte Acrolein identifiziert werden (Cox, 1979). Der Nachweis von Acrolein erfolgt photometrisch bei 210nm (Low et al., 1982).

Nor-HN2:

(NorNitrogen Mustard)



Alkylierendes Produkt aus der - vermutlich spontanen und enzymatischen (s.u.) - Aufspaltung von PAM in Nor-HN2 und Phosphorsäure-mono-amid. Nach CPA Applikation wird Nor-HN2 verstärkt im Urin behandelter Mäuse ausgeschieden (Suling et al., 1978). Aufgrund seiner alkylierenden Eigenschaften ist Nor-HN2 cytotoxisch und hoch mutagen (Ellenberger, Mohn, 1977; s.u.) Die cytotoxische Aktivität ist gegenüber PAM vermindert (1.4 gegen 7.5 CU/uMol); die cytotoxische Spezifität etwas erhöht (10×10^{-2} gegen 8×10^{-2} (CU/uMol) x min) (nach Brock, Hohorst, 1977). Nach Colvin et al. (1976) alkyliert auch Nor-HN2 über ein Aziridinium Zwischenprodukt, ist aber bei physiologischen Bedingungen pH 7.4 erheblich weniger reaktiv als PAM. Letzteres steht in Widerspruch zu in vitro Tests mit *S. cerevisiae*, wonach Nor-HN2 unter physiologischen Bedingungen aufgrund seiner im Vergleich zu PAM sehr hohen Alkylierungspotenz hoch cytotoxisch ist. Entgegen den Aussagen aus NBP-kolorimetrischen Messungen bleibt diese alkylierende Fähigkeit unter physiologischen Bedingungen lange stabil (>12h) (Fleer, Brendel, 1982). Aus dem Aziridinium Zwischenprodukt von Nor-HN2 kann nach Friedman und Berger (1961) leicht N-2-chloroäthylaziridin gebildet werden. Diese Verbindung ist ungeladen, stabil und damit ein schlecht alkylierendes Agens (s. Colvin et al., 1976).

IV.2.a. 'Aktivierung mit Ratten S9'

CPA sowie seine Metabolite wurden bisher unter den verschiedensten Bedingungen und Aspekten und in unterschiedlichsten Kombinationen im Salmonella/ Mikrosomen Assay untersucht (s. Balbinder et al., 1981; Hales, 1981 a, b, 1982; Hales, Jain, 1980 a, b; Benedict et al., 1977; Lijinsky, Andrews, 1980; Mohn, Ellenberger, 1976; Pak et al., 1979; Suling et al., 1978). Ein Vergleich aller zentralen Metabolite unter identischen Bedingungen in

vitro - wie hier vorgestellt - ist mit diesem Verfahren bisher, soweit bekannt, nicht durchgeführt worden.

Im Salmonella/Mikrosomen Assay wie auch in Untersuchungen mit anderen Bakterientestverfahren (z.B. E.coli: Ellenberger, Mohn, 1977; Gatehouse, 1978) erwiesen sich die Abbauprodukte von CPA als Auslöser von Mutationen des Basenpaar-Substitutionstyps. Frame-shift-Mutationen werden nicht induziert.

In Tests mit eukaryotischen Zellen erwiesen sich CPA und seine Metabolite ebenfalls als sehr mutagen. Untersuchungen wurden hier an Hefen (Callen, Philpot, 1977; Flier, Brendel, 1982; Mayer et al., 1976; Mohn, Ellenberger, 1976) und an Zellkulturen speziell von Lymphozyten oder CHO- (Chinese Hamster Ovary) Zellen bei in vitro Tests (Benedict et al., 1978; de Raat, 1977; Waalkens et al., 1980), sowie an Knochenmarkzellen bei in vivo Tests (Dragani et al., 1981) durchgeführt. Gemessen wurde bei Zellkulturen die Fähigkeit der Substanzen zur Induktion von SCEs (Sister Chromatid Exchanges) bzw. bei Hefen die Fähigkeit zur Induktion von Punktmutationen und Rekombinationsereignissen.

Allgemein wurde nachgewiesen, daß CPA zur Entwicklung aller seiner Eigenschaften der metabolischen Aktivierung bedarf (Anti-Tumor-Eigenschaften: s. Brock, 1978; Brock, Hohorst, 1977; Oncogenität: Benedict et al., 1978; Mutagenität: Ellenberger, Mohn, 1977; Teratogenität: Fantel et al., 1979).

Bei einigen Autoren (Gatehouse, 1978 (E.coli); Mayer et al., 1976 (Sacch. cerev.)) ergaben sich unter speziellen experimentellen Bedingungen Hinweise auf eine geringe spontane Umsetzung von CPA zu mutagenen Produkten. CPA wurde in diesen Experimenten ohne Zusatz externer Metabolisierungssysteme in hohen Konzentrationen ($\geq 10^{-2}$ M) in Langzeitbehandlungen bzw. nach Vorlagerung in Phosphatpuffer (bis zu 7d bei E.coli) bei 37° C an diesen Organismen auf seine Mutagenität getestet. Mit zunehmender Behandlungs- und auch Inkubationszeit konnte eine Erhöhung der mutationsinduzierenden Eigenschaften des nicht extern aktivierten CPA gezeigt werden. Auch Waalkens et al. (1981) fand eine dosisabhängige Zunahme der SCE-Rate bei Behandlung von Lymphozyten-Kulturen (Ratte, Kaninchen, Mensch) mit nicht aktiviertem CPA. Er führte diesen Effekt auf die enzymatische Metaboli-

sierung von CPA durch das - auch in Lymphozyten in geringem Maße vertretene - Cytochrom P-450 mischfunktionelle Oxidasesystem zurück. Die Zellen werden in diesen Experimenten zwar für 2 Tage der CPA Behandlung ausgesetzt, die sensible Phase für die Induzierung der bei der Auswertung sichtbaren SCEs beläuft sich aber nur auf den Zeitraum bis zur ersten Mitose (ca. 8-12 h). Waalkens et al. konnte ihrem System noch Effekte bei 5×10^{-4} M CPA im Ansatz nachweisen.

Auch die Ergebnisse aus dem Langzeitbehandlungsexperiment von Mayer et al. (1976) dürften nach den ausführlichen Experimenten von Callen, Philpot (1977) auf enzymatische Aktivierung von CPA durch das Cytochrom P-450 System zurückzuführen sein. Letztere Autoren wiesen eindeutig den Zusammenhang nach, der zwischen dem Cytochrom P-450-Gehalt der Hefezellen und ihrer Fähigkeit, Promutagene zu Mutagenen zu aktivieren und sie als solche zu dektieren, besteht.

Es ist durchaus nicht erstaunlich, daß CPA ohne jegliche Aktivierung unter den gewählten Bedingungen Mutationen induzieren kann. Die N-Lost Gruppe von CPA wird durch den Oxazaphosphorinring in ihrer Reaktivität stark behindert. Durch die Lokalisation der Elektronen zum Ring wird die Abspaltung von Cl^- aus einer der Chloroäthyl-Gruppen erschwert und damit die Ausbildung des Aziridinium-Zwischenproduktes als Vorstufe zu Alkylierungsreaktionen. Während längerfristige Lagerung in Phosphatpuffer bei 37°C ist ein geringer Spontanzerfall - wie bei jeder komplexeren organischen Verbindung - sehr wahrscheinlich. Betrachtet man die eingesetzten hohen Konzentrationen, bei denen diese Effekte auftreten, bietet sich diese Erklärung an. Bei einer Öffnung des Oxazaphosphorinringes gewinnt die bis(chloroäthyl)-Gruppe wie o.a. automatisch an Reaktivität, das Molekül also an alkylierendem = mutagenen Potential.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten erwies sich CPA ohne Aktivierung durch S9-Mix als nicht mutagen im Salmonella Assay. Der getestete Konzentrationsbereich betrug 62 - 500 ug CPA/Platte ($\Delta 7.4 \times 10^{-5}$ M - 6×10^{-4} M CPA). Auch bei Lagerung in A.dest., 0.9 % NaCl oder 0.1 M Na_2HPO_4 pH 7.4 bei $+4^\circ \text{C}$ im Dunkeln bis zu 4 Wochen ergab sich keine wesentliche Änderung des mutagenen Potentials von CPA weder bei anschließender Testung ohne S9-Mix noch bei Testung mit Metabolisierung durch S9-Mix im Ames-Test.

Die sensible Phase zur Induktion von Rückmutationen zur Histidin-Prototrophie, die zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer Mutantenkolonien führt, erstreckt sich bei diesem Testverfahren über die ersten Zellteilungen nach Mischen des Testansatzes (ca. 2 h). Diese Zeit errechnet sich aus der Histidinkonzentration im Top Agar, die maximal 3-4 Teilungen der histidinbedürftigen Testerbakterien zuläßt, und einer möglichen 'lag-Phase' der Bakterien, verursacht durch den Medienwechsel (Anzuchtmedium/Testmedium). Diese 'lag-Phase' ist für den verwendeten Stamm TA 1535 vernachlässigbar (zu Auswirkungen weiterer externer Einflüsse auf die Ergebnisse im Ames-Test s. Friedrich et al., 1982). Die Generationszeit von Salmonella liegt unter den gegebenen Bedingungen bei 30min.

Diese kurze effektive Einwirkungszeit für die Induktion von Mutationen, die zur Auswertung sichtbar werden, ist einer der Nachteile des Standard Salmonella/Mikrosomen Assay. Substanzen, die erst bei chronischer Dosierung wirksam werden, werden nicht erfaßt.

Ein weiterer Nachteil ist die hohe Spezifität der zu induzierenden Rückmutation - übrigens ein Nachteil aller Punktmutationstests. Voraussetzung für das Auftreten einer sichtbaren = auswertbaren Mutation sind mehrere Bedingungen, die gleichzeitig erfüllt sein müssen:

1. die Mutation muß dem detektierbaren Typ entsprechen (z.B. frame-shift, base-pair-substitution);
2. die Mutation muß genau an der einen Markerstelle in dem speziellen Gen auftreten, auf die die Selektion und Auswertung eingerichtet sind. Sämtliche Mutationen, die im übrigen Genom auftreten, werden nicht erfaßt. (Ein Bakteriengenom umfaßt 10^6 - 10^7 Nukleotidpaare; in den somatischen Zellen des Menschen (diploider Chromosomensatz) liegt der Wert bei 6×10^9 Nukleotidpaaren);
3. die Mutation muß während einer einmaligen meist nur wenige Stunden dauernden sensiblen Phase induziert werden.

Wird das bakterielle Testsystem ohne weitere externe Metabolisierungszusätze

verwendet, lassen sich zwar direkt wirkende mutagene Substanzen nachweisen, die Relevanz der Ergebnisse ist aber - bezogen auf in vivo Verhältnisse - zweifelhaft, da Deaktivierungsprozesse im Organismus vernachlässigt werden.

Bei Einsatz externer Metabolisierungssysteme (S9-Fractionen, Mikrosomen usw.) lassen sich auch indirekt wirkende Mutagene erfassen, sowie Deaktivierungsprozesse mit berücksichtigen. Einschränkungen ergeben sich hier aber aus folgenden Gründen:

1. der Metabolisierungsprozeß sollte vor Beendigung der sensiblen Phase abgeschlossen sein;
2. es läßt sich allgemein jeweils nur eine Metabolisierungsfraktion/Ansatz sinnvoll testen (z.B. S-Fraktion oder Mikrosomen aus Leber oder Niere oder Lunge usw.). Dieses Faktum kann sowohl vorteilhaft sein, zur Auffindung der Organe/Gewebe mit der zentralen Metabolisierungskapazität und Spezifizierung der daran beteiligten Enzyme. Andererseits ergibt sich der Nachteil, daß ein Zusammenwirken von Organen in vivo bei der Aktivierung/Deaktivierung nicht erfaßt werden kann;
3. die Metabolisierungssysteme nehmen selbst Einfluß auf die eingesetzten Indikatororganismen. Bei hohen Konzentrationen werden die Indikatoren selbst geschädigt -"anverdaut" -. Hierauf reagieren besonders Zellkulturen (CHO, Lymphozyten) empfindlich, aber auch Bakterien. Allgemein bewirkt der alleinige Zusatz des Metabolisierungsmixes schon einen Anstieg der Spontanmutationsrate (s. Pak et al., 1982).

Trotz dieser Einschränkungen ist das Salmonella/Mikrosomen Assay wegen seines relativ geringen experimentellen Aufwandes sicherlich eine geeignete Methode für ein erstes 'Pre-Screening' von Substanzen. Die Relevanz der Resultate für die Verhältnisse in vivo muß in jedem Einzelfall durch zusätzliche Tests geprüft werden. Das Salmonella Assay läßt sich aber neben dem 'Pre-Screening' - wie in dieser Arbeit gezeigt - auch sehr gut als Indikator zur Klärung spezifischer Fragen einsetzen; z.B. zur Untersuchung der Beteiligung isolierter Enzyme/Enzymsysteme oder Gewebsextrakte am Metabolis-

mus einer Substanz (s. IV.2.b.) oder der Bedeutung spezieller Schritte im Metabolismus (s. IV.1.).

Besonders Hales und Jain hatten in letzter Zeit (1980 a,b; Hales, 1980, 1982) mit dem Salmonella Assay mutagene Eigenschaften von CPA und verschiedene Arten von in vitro Metabolisierungssystemen auf die Aktivierung von CPA untersucht. Danach wird CPA vornehmlich durch Leberextrakte aus mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren aktiviert. Untersucht wurden Extrakte aus Rattenlebern. Aroclor 1254-Induzierungen erwiesen sich als weniger effizient. β -Naphthoflavon-Induzierungen erwiesen sich als wirkungslos. Sie minderten eher - ähnlich wie 3-Methylcholanthren (3-MC)-induzierte Extrakte - die mutagenen Eigenschaften von CPA. Beide letztgenannten Substanzen induzieren spezifisch Cytochrom P-448, während Phenobarbital Cytochrom P-450, Aroclor 1254 die Cytochrome P-448 und P-450 induzieren (s. II.5.1.a.). Für männliche Tiere wurde in der Leber die 3-fache Aktivierungskapazität für CPA gegenüber weiblichen Tieren gefunden. Die Nieren erwiesen sich bei den männlichen Ratten als nur schwach aktivierend, bei den weiblichen Tieren war keine Aktivierungskapazität nachweisbar.

Auffällig ist bei diesen Resultaten einmal die große Diskrepanz zwischen dem Effekt auf die CPA-Aktivierung (Phenobarbital: 13-fache-, Aroclor 1254: 11-fache Steigerung gegenüber uninduzierten Fraktionen) und dem Anstieg der Cytochrome P-448 und P-450 (PB: ca. 3-fach, Aro: ca. 3.3-fach), zweitens die zwar hohe Wirksamkeit des Cytochrom P-450-Inhibitors SKF 525 auf die Aktivierung von CPA, aber der Ausfall der Wirkung sowohl des Cytochrom P-450-Inhibitors Metyrapon als auch des P-448-Inhibitors α -Naphthoflavon. Das läßt den Schluß zu, daß es sich bei dem durch PB induzierbaren Cytochrom P-450 um ein anderes Enzymsystem handelt als dem durch Aroclor 1254 induzierbaren. Da es sich nach den pharmakokinetischen Untersuchungen mit 4'-d₂-CPA bei der 4-Hydroxylierung nicht um einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt (s. IV.1.; Isotopeffekt: 1-1.4 (Cox et al., 1976 a)) - diese Reaktion wird bekanntlich durch das Cytochrom P-450-System katalysiert -, müssen andere Enzyme an der Aktivierung von CPA wesentlich beteiligt sein. Sie werden scheinbar durch PB bzw. Aroclor 1254 induziert. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sie auch in den Mikrosomen lokalisiert sind, da sich nach Hales die beschriebenen Effekte qualitativ und quantitativ

identisch für S9-Fraktionen und Mikrosomen nachweisen lassen.

Bestimmte induzierbare Enzyme haben nachweislich keinen Effekt auf die Aktivierung von CPA. So konnte im Rahmen meiner Untersuchungen keinerlei Korrelation zwischen der Benzo(a)pyren-Hydroxylase-Aktivität (Leitenzym zur Charakterisierung der Enzymaktivität kommerzieller S9-Chargen) der von mir verwendeten kommerziellen Rattenleber S9-Fraktionen und der Aktivität dieser Fraktionen zur Metabolisierung von CPA zu mutagenen Produkten festgestellt werden. Dieser Befund stützt Untersuchungen von de Raat (1977) mit Rattenleber S9-Fraktionen an CHO-Zellen. Er hatte damals nachgewiesen, daß es sich bei der CPA-Aktivierung um eine NADPH-verbrauchende Reaktion handelt. Am deutlichsten wurde der CPA-abhängige NADPH-Verbrauch durch Aroclor 1254-Induktion gesteigert, gefolgt von PB-Induktion. 3-MC-Induktion erbrachte keinen Effekt gegenüber unbehandelter S9-Fraktion.

Wie von mir im Teil Resultate unter III.2.1.1. ausführlich dargestellt, wurde für CPA, 5'5-d₂-CPA sowie sämtliche getesteten Metabolite - bis auf Carboxy-PA und Acrolein - im Salmonella/Mikrosomen Assay mit S9-Fraktionen aus Lebern männlicher Ratten die Effektivitätsreihenfolge der Induktoren für die Aktivierung der Substanzen gefunden:

Phenobarbital > Aroclor 1254 > nicht-induziert

Die Unterschiede sind am stärksten ausgeprägt bei CPA, 5'5-d₂-CPA und im oberen Dosisbereich von 4-OH-peroxy-CPA, gering bei PAM, Nor-HN2 und im unteren Dosisbereich von 4-OH-peroxy-CPA, sowie vernachlässigbar bei 4-ke-to-CPA.

Für Acrolein konnten in dem engen Konzentrationsbereich, in dem die Substanz schwach mutagen wirkt, keine Unterschiede zwischen den S9-Fraktionen nachgewiesen werden.

Carboxy-PA zeigt als einzige Substanz die Reihenfolge Aroclor 1254 Phenobarbital nicht induziert. Der Theorie zufolge wäre die mutagene Aktivierung von Carboxy-PA im Gegensatz zu den anderen Metaboliten und CPA vor-

nehmlich Cytochrom P-448-abhängig. Oder von zusätzlichen Enzymen, die spezifisch durch Aroclor 1254 induziert werden (s.o.). Verantwortlich für die hohe mutagene Aktivität von Carboxy-PA dürfte die direkte enzymatische Spaltungsmöglichkeit in PAM und Hydacrylsäure sein.

Der Einsatz der unterschiedlich vorinduzierten Leber-S9-Fractionen ändert aber in keinem Fall die Reihenfolge der Metaboliten in ihrem Potential zur Induktion von Punktmutationen. Zur Erinnerung: Nor-HN2 > PAM > Carboxy-PA ≥ 4-OH-peroxy-CPA >> 4-keto-CPA > CPA > 5'5-d₂-CPA. (Für E.coli wurde für verschiedene Mutationsorte auch die Reihenfolge Nor-HN2 > PAM gefunden (Erlenberger, Mohn, 1977)).

Es ist nochmals anzumerken, daß in der S9-Fraktion neben den Mikrosomen auch noch sämtliche löslichen Enzyme der Zellen vertreten sind. Allein Zelltrümmer, Kerne und der überwiegende Teil der Mitochondrien sind entfernt. So sind z.B. ATP, ADH, ADO, GPDH, Esterasen, Amylasen, Peroxydasen in der S9-Fraktion noch vorhanden.

Die S9-Fraktion stellt also einen sehr breitbandigen, unspezifischen Enzym-Mix dar, der sich zur Simulation des generellen Leberstoffwechsels anbietet (s. Arni et al., 1980). Vernachlässigt werden dabei allerdings Transportvorgänge jeglicher Art (Diffusion, akt. Transport) wegen des Fehlens der entsprechenden Membranen. Aufgrund der 'Barrierefunktion' der Membranen auftretende Ausschlußmechanismen und Konzentrationsgradienten können in diesem System nicht berücksichtigt werden.

Die Verwendung von Mikrosomen (P-100, P-105) grenzt die Zahl der Enzyme stark ein. Es werden dabei allein partikelgebundene Enzyme - in der Hauptsache die Cytochrom-Komplexe P-450 und P-448 - erfaßt. Der Überstand (S-100, S-105) enthält die löslichen Enzyme, die in diesem Fall getrennt von den Mikrosomen getestet werden können.

Die in der Mutantenausbeute übereinstimmenden Resultate für CPA aus der hier vorliegenden Arbeit mit den von Hales (s.o.) sowohl mit S9-Fractionen

als auch mit Mikrosomen erhaltenen lassen ebenfalls darauf schließen, daß primär Mikrosomen an der Aktivierung von CPA beteiligt sind.

Interessant ist die Aktivierung aller Metabolite - mit Ausnahme von 4-keto-CPA - durch den S9-Mix zu höher mutagenen Produkten.

Man kann daraus in Zusammenhang mit Literaturdaten schließen, daß 4-keto-CPA ein endgültiges Deaktivierungsprodukt von CPA ist (sehr geringe mutagene, teratogene und cytotoxische Wirksamkeit; s. III.2.1., Mirkes et al., 1981; Brock, 1976). Seine geringe Mutagenität bei Dosen über 125 µg/Platte ($\approx 1.5 \times 10^{-4}$ M) könnte auf einer Rückreaktion zu 4-OH-CPA beruhen, katalysiert durch eine ADH. Dieses Enzym ist sehr wahrscheinlich auch in *Salmonella* vorhanden und in der Lage, sowohl zu dehydrogenieren als auch zu hydrogenieren.

Bei allen übrigen Metaboliten ist nach den vorliegenden Ergebnissen davon auszugehen, daß das mutagene Potential durch Metabolisierung mit S9-Mix verstärkt wird. Diese Reaktionen laufen sowohl spontan ab, werden durch den S9-Mix aber beschleunigt.

Als Beispiel PAM (III.2.1.1. Abb. 12 f): Der Zusatz von S9-Mix zu frisch angesetzter PAM-Lösung erbringt höhere Mutationsraten als die Testung ohne S9-Mix. Wird die PAM-Lösung 1 Woche bei +4° C im Dunkeln vor dem Test gelagert und dann unter Zusatz von S9-Mix getestet, ergeben sich Mutantenzahlen, die denen entsprechen, die mit frisch angesetzter Lösung des Folge-metaboliten von PAM - Nor-HN2, in gleicher Dosis wie die PAM-Lösung mit S9-Aktivierung getestet - erhalten werden.

Diese Tatsache ist aus einem weiteren Grund interessant. Die Mutantenzahlen von Nor-HN2 ohne S9-Mix entsprechen denen von PAM mit S9-Mix-Aktivierung. D.h., der Schluß liegt sehr nahe, daß die alkylierende Reaktion, die zum mutagenen Ereignis führt, zumindest in *Salmonella* nicht direkt durch PAM, sondern durch Nor-HN2 vermittelt wird. Die Alkylierung durch Nor-HN2 selbst wird den Resultaten nach enzymatisch begünstigt oder durch ein enzymatisch

produziertes Folgeprodukt verursacht.

Untersuchungen von Fleer und Brendel (1982) weisen an *S. cerevisiae* ebenfalls Nor-HN2 als den Metaboliten mit der höchsten Cytotoxizität nach. Die cytotoxische Aktivität eines Alkylans ist allgemein eng mit seiner Fähigkeit Interstrang-cross-links in der DNA auszubilden korreliert (s. einschlägige Lit. in der Molekularbiologie und Photobiologie). Die Reihenfolge in der Toxizität der Substanzen ist nach diesen Autoren Nor-HN2 > 4-OH-peroxy-CPA > PAM. Bei gleicher Überlebensrate ist die Zahl der induzierten Cross-links für Nor-HN2 und 4-OH-peroxy-CPA identisch. -

Die hier vorgestellten Untersuchungen an menschlichen peripheren Lymphocyten (PL) (SCE-Induktion) bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse mit *Salmonella*. Es macht sich hier aber eine stärkere Differenzierung in toxische und mutagene Eigenschaften bemerkbar. Von der Mutagenität betrachtet ist die Aktivitätsreihenfolge: PAM > 4-OH-peroxy-CPA > Nor-HN2 >> Carboxy-PA >> 4-keto-CPA >> CPA.

Zieht man die Toxizität mit in Betracht, verschiebt sich die Reihenfolge in: 4-OH-peroxy-CPA $\geq$ Nor-HN2 > PAM >> Carboxy-PA >> 4-keto-CPA >> CPA.

Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung sowohl mit den von Fleer und Brendel berichteten Effekten auf Hefe-DNA, den Resultaten aus dem *Salmonella* Assay und auch den Theorien über die cancerostatisch/cytotoxisch wirksamen Metabolite von CPA in vivo, die 4-OH-CPA als auch PAM zusammen mit Nor-HN2 eine zentrale Rolle zuschreiben. Alle 3 Metabolite werden nach CPA-Behandlung in Blut und Urin von Testtieren und Patienten in relativ hohen Konzentrationen nachgewiesen (Maus: Suling et al., 1978; Patienten: Cox, Levin, 1975; Jardine et al., 1978; Wagner et al., 1977, 1980).

Nach neuesten Ergebnissen von Obe (Veröff. in Vorbereitung) mit CHO-Zellen erweist sich PAM ohne S9-Aktivierung gegenüber Nor-HN2 als etwas stärker mutagen (Dosisbereich 3×10^{-7} - 1×10^{-5} M; als Beispiel die SCE-Raten bei 1×10^{-6} M PAM bzw. Nor-HN2: -S9-Mix: 9.46 ± 0.36 bzw. 7.80 ± 0.40 , +S9-Mix: 13.40 ± 0.47 bzw. 12.42 ± 0.61).

Mit S9-Mix-Aktivierung (Rattenleber Aroclor 1254 induziert) wird die Mutagenität beider Substanzen leicht erhöht, gleichzeitig werden die induzierten SCE-Raten aber nivelliert. Bei Nor-HN2 treten bei Konzentrationen über 3×10^{-6} M keine 2. Metaphasen mehr auf, d.h., Nor-HN2 wirkt dort stark cytotoxisch auf proliferierende Zellen. Die Ursache dürften Cross-links in der DNA sein.

Diese Ergebnisse könnten m. E. vorzugsweise dahingehend interpretiert werden, daß

1. Nor-HN2 und nicht PAM die endgültige cytotoxische Wirkung von CPA trägt und daß
2. die Alkylierung nicht durch Nor-HN2 selbst stattfindet, sondern eine enzymatische Reaktion die Endreaktion zur Cytotoxizität vermittelt; sei es durch Umwandlung zu einem reaktiveren oder aktivierten Zwischenprodukt oder durch Vermittlung der Cross-linking-Reaktion, nachdem Nor-HN2 mit einem DNA-Strang ein Monoaddukt gebildet hat.

Es ist hinreichend bekannt, daß Monoaddukte an der DNA zwar mutagen aber reparabel sind und damit keinen unbedingten Letalschaden für eine Zelle darstellen. Hingegen ist das Auftreten von Cross-links nur in sehr geringer Zahl tolerierbar, ihre Reparierbarkeit ist fraglich, die Induktion von Mutationen geringer als bei Monoaddukten, die Letalitätsrate bedeutend höher.

Nor-HN2 und PAM sind gleichermaßen bifunktionelle Alkylantien. Den vorliegenden Resultaten und Daten nach zu urteilen, scheint PAM unter physiologischen Bedingungen gut zu alkylieren, wenn die mutagene Wirkung als Maß benutzt wird. Das läßt darauf schließen, daß PAM bevorzugt Monoaddukte bildet, PAM also die mutagene Wirkung von CPA zugeschrieben werden kann. Wegen des Phosphorsäureamidrestes dürfte nach der Monoalkylierung die Freisetzung des Cl^- -Ions aus der zweiten Chloroäthylgruppe zur Ausbildung der Aziridin-Ionenstruktur als Vorstufe zur weiteren Alkylierung (= Cross-linking) erschwert sein. Bei Nor-HN2 besteht diese Behinderung durch den Rest nicht, er ist durch ein H-Atom substituiert, das die Abspaltung des zweiten Cl^- eher begünstigt. Unter Umständen spielen auch sterische Unter-

schiede der beiden Moleküle bei der Möglichkeit zur Ausbildung von Cross-links eine Rolle.

Nach neueren Untersuchungen von Hales (1981 a, 1982) ist auch die teratogene von der mutagenen Wirkung von CPA abzutrennen. Den präsentierten Daten zufolge ist auch hier PAM gegenüber 4-OH-CPA der stärker mutagene Metabolit. Die Autorin wies weiterhin nach, daß der potenteste teratogene Metabolit in vivo Acrolein zu sein scheint, gefolgt von 4-OH-CPA. Acrolein hat wie bei der Mutagenität auch dort einen sehr eng begrenzten Konzentrationsbereich in Bezug auf seine Wirksamkeit. Möglicherweise spielt die Umsetzung zu Acrylsäure bei der Entwicklung der teratogenen Eigenschaften eine Rolle (s. a. Patel et al., 1980). Nach Hales bewirken Acrolein und 4-OH-CPA das gleiche Mißbildungsmuster, wie es durch aktiviertes CPA verursacht wird; PAM hingegen produziert ein anderes Muster.

Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu den Berichten von Mirkes et al. (1981), die bei Testung an in vitro kultivierten Rattenembryonen für aktiviertes CPA und für PAM ein histologisch, histochemisch und makroskopisch identisches Muster teratogener Schäden beobachteten. Für Acrolein konnte dort keine Teratogenität nachgewiesen werden. Letzteres mag am experimentellen Ansatz liegen, da Acrolein unter den Versuchsbedingungen hoch flüchtig ist und somit bei in vitro Tests vor Einsetzen der Wirkung aus dem Ansatz entweicht.

Wegen der schon andiskutierten Probleme bei der Übertragung von in vitro gewonnenen Resultaten auf in vivo Verhältnisse sind m. E. die Ergebnisse von Hales, die die drei Hauptkandidaten für Teratogenität und Mutagenität von CPA - PAM, Acrolein, 4-OH-CPA - im Vergleich im in vivo Test berücksichtigen, vorzuziehen.

Der Vollständigkeit halber sollen Untersuchungen von Hales (1981 a) und Cox (1979) mit Thiol-Verbindungen (Cystein, Cystin, Gluthation u.ä.) bzw. ihr Einsatz zur Unterbindung unerwünschter Nebeneffekte bei der CPA-Therapie erwähnt werden. Die Wirksamkeit dieser Substanzklasse gegen die mutagenen und teratogenen Wirkungen von reaktiven Alkylantien, Aldehyden und

auch von aktiviertem CPA sind bewiesen. Meist wird neben der Dämpfung der Nebeneffekte aber auch eine Minderung der cytotoxischen/cancerostatischen Eigenschaften von CPA erreicht. Sehr niedrige Dosierungen scheinen die mutagenen und teratogenen Effekte von CPA zu verstärken, höhere Konzentrationen der Thiol-Komponenten dagegen vermindern diese Effekte. N-acetyl-cystein und Na-2-mercapto-äthan (Mesnum^R) schützen vor Nebeneffekten, die nachweislich durch Acrolein verursacht werden, ohne die Anti-Tumor- und immunsuppressiven Eigenschaften von CPA wesentlich zu beeinflussen. Die Produktion der alkylierenden Metabolite wird nach diesen Berichten weder in vitro noch in vivo behindert. Die Ursachen für das biphasische Verhalten und die differenzierte Wirkungsweise der Thiol-Komponenten sind noch unbekannt.

IV.2.b. 'Aktivierung mit Maus-S9'

Die unterschiedliche Reaktion der beiden untersuchten Mäusestämme C 57 BL/6J Kch und CBA/J Kch auf die teratogenen Wirkungen von CPA ist in III.2.3. dokumentiert. In Tabelle 9 eine zusätzliche statistische Auswertung der Hauptschädigungsformen Polydactylie (a) und Gaumenspalten (b).

Tab. 9: Unterschiede in der Ausprägung der teratologischen Hauptschädigungstypen von CPA bei der Maus (Behandlung am Tag 11 p.c.) zwischen den Stämmen C 57 BL/6J Kch und CBA/J Kch. Durchgeführt wurde der χ^2 -Test mit Yales-Korrektur für kleine Ereigniszahlen von Frau Dr. Kocher-Becker.

a) Polydactylie

CPA-Dosis		12 mg/kg	9-12-20 mg/kg gepoolt
Vorderextremität (VE)	<u>C 57 BL/6J</u>	p < 0.05	p < 0.01
	CBA/J		
Hinterextremität (HE)	<u>C 57 BL/6J</u>	p < 0.001	p < 0.001
	CBA/J		
VE und HE	<u>C 57 BL/6J</u>	p < 0.001	p < 0.001
	CBA/J		

b) Gaumenspalten

12-20 mg CPA/kg	
<u>CBA/J</u>	p < 0.01
C 57 BL/6J	

D.h., Polydactylie tritt bei dem Stamm C 57 BL/6J hochsignifikant häufiger auf als bei CBA/J.

Gaumenspalten treten signifikant häufiger bei CBA/J als bei C 57 BL/6J auf.

Die Mäusestämme CBA/J Kch und C 57 BL/6J Kch sind genetisch definierte Inzuchtstämme. Es ist bekannt, daß zwischen verschiedenen Inzuchtmäusestämmen genetisch determinierte Unterschiede in der Induzierbarkeit von Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylasen (AHH) und anderer Enzymkomponenten des Mischfunktionellen Oxidase Systems (MFO) bestehen. Von C 57 BL/6 und CBA ist zudem bekannt, daß die AHH sowie andere Enzyme des Cytochrom P-450/ P-448-MFO-Komplexes induzierbar sind (Ah-Locus induzierbar, Ah^b) (s. Filler, Lew, 1981; Nebert et al., 1978). In den Mäusestämmen DBA/2, AKR - hier nicht untersucht - sind die MFO-Enzyme nicht induzierbar (Ah^d). Aus den Unterschieden in der Induzierbarkeit dieses Enzymkomplexes zwischen den Stämmen C 57 BL/6J (Ah^b, responsive) und DBA/2 (Ah^d, non-responsive) ergeben sich die folgenden Konsequenzen für die Stämme: Ah^b-Stämme (responsive) weisen hohe Empfindlichkeit gegenüber indirekt wirkenden polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH = polycyclic aryl hydrocarbons) in Bezug auf Tumorinduzierung, in PAH-induzierter Auslösung von Resorptionen, Geburtsdefekten, Abnahme des Geburtsgewichts, aber auch höhere Resistenz als Ah^d-Stämme (non-responsive) gegenüber toxischen Wirkungen von Lindan, Benzo(a)pyren und 3-MC auf. Die Induzierbarkeit dieses Enzymkomplexes ist nicht auf die Leber beschränkt, sondern in zahlreichen anderen Geweben ebenfalls nachzuweisen. Mit dem Ah^b-Allel ist eine hohe metabolische Aktivität von Gewebeextrakten aus den entsprechenden Stämmen direkt korreliert. Im Salmonella Assay führt der Einsatz von Gewebeextrakten aus Ah^b-Stämmen bei der in vitro Metabolisierung von diversen chemischen Carcinogenen zu hohen Mutationsraten. Gleichfalls ist die Zahl von spezifischen Metaboliten chemischer Carcinogene, die an DNA-Nukleoside gebunden sind, sehr hoch (Nebert et al., 1978).

Interessanterweise ist die Induktion von SCEs in Knochenmarkszellen durch CPA-Behandlung im in vivo Experiment bei DBA/2 und AKR (Ah^d, non-responsive) signifikant höher als bei C 57 BL/6J und anderen Ah^b (responsive)-Stämmen (Dragani et al., 1981).

In diesem Zusammenhang sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen:

1. Folgende Enzymaktivitäten werden von der Induzierbarkeit durch das Ah-Gen beeinflusst (A) bzw. nicht beeinflusst (B) (Tabelle aus I. E. Lush in 'Biologie of the House Mouse' ed. R. J. Berry, Academic Press, N. Y., 1981).

Mouse microsomal enzyme activities whose inducibility is (A) affected by the Ah gene, or (B) not affected by the Ah gene^a

A	B
Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)	Aminopyrine <i>N</i> -demethylase
<i>p</i> -Nitroanisole <i>O</i> -demethylase	<i>d</i> -benzphetamine <i>N</i> -demethylase
7-Ethoxycoumarin <i>O</i> -deethylase	Diphenylhydantoin hydroxylase
Zoxazolamine 6-hydroxylase	Hexobarbital hydroxylase
Dimethylaminoazobenzene <i>N</i> -demethylase	Pentobarbital hydroxylase
2-Acetylaminofluorene <i>N</i> -hydroxylase	Aniline hydroxylase
Phenacetin <i>O</i> -deethylase	Benzenesulphonamide hydroxylase
Biphenyl 2-hydroxylase	Chlorcyclizine <i>N</i> -demethylase
Biphenyl 4-hydroxylase	Ethylmorphine <i>N</i> -demethylase
Acetanilide 4-hydroxylase	Testosterone 7 α -, 16 α -, and 6 β -hydroxylases
Naphthalene monooxygenase	
Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylase	
Acetaminophen <i>N</i> -hydroxylase	
<i>p</i> -chloroacetanilide <i>N</i> -hydroxylase	
UDP glucuronyltransferase	

^aData from Thorgeirsson & Nebert (1977) and Nebert, Atlas *et al.* (1978).

- Die Induzierbarkeit der Ah-Loci ist unabhängig von der stammspezifischen und individuellen Ursprungskonzentration der MFO-Enzyme im Gewebe.
- Die Stämme CBA und C 57 BL unterscheiden sich in der im Urin ausgeschiedenen Menge der Aminosäure Taurin (Endprodukt des Schwefelstoffwechsels, primär als Konjugat an Gallensäuren biliär ausgeschieden). Die Plasma-Level von Taurin sind in beiden Stämmen identisch. Dieser Unterschied (10-fach höhere Ausscheidung im Urin von CBA) beruht auf Differenzen in der Nieren-Clearance. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Rückresorption von Taurin in CBA in der luminalen Membran des proximalen Tubulus blockiert ist (s. Bulfield, 1980).

Die in dieser Arbeit zum Komplex 'Induzierbarkeit von CPA-Metabolisierungs-enzymen' von mir vorgenommenen Experimente belegen einmal, daß die Metabolisierung von CPA zu mutagenen Produkten überwiegend durch PB-induzierbare Systeme - also den Cytochrom P-450 MFO-Komplex - vollzogen wird (s. III.2.1.1. und IV.2.a.). Daß Unterschiede in der CPA-Aktivierung zwischen den beiden Stämmen auf enzymatischer Ebene bestehen, wird aus Experimenten mit Extrakten aus Nieren-Gewebe beider Stämme deutlich (III.2.1.2., Abb. 14, 15 b, Tab. 3). Dort ergaben sich für C 57 BL in der Metabolisierungskapazität zwischen Extrakten aus Nieren mit oder ohne Nebennieren keine Unter-

schiede, während die Aktivierungskapazität von Nierenextrakten ohne Nebennieren von CBA deutlich geringer war, Extrakte aus Nieren und Nebennieren von CBA aber höhere Aktivität als Extrakte von C 57 BL und Nierenextrakte ohne Nebennieren von CBA auswiesen.

Ebenfalls gering höhere Aktivierungskapazität für CPA (ca. 30 %) und die meisten CPA-Metabolite wies die Leber-S9-Fraktion CBA (nicht induziert) gegenüber C 57 BL (nicht induziert) auf. Die Metabolisierungskapazität von Leber-S9 für CPA entspricht bei C 57 BL der von Nieren-S9 (+NNR sowie -NNR). Bei CBA liegt die Kapazität von Leber-S9 noch über der von Nieren+NNR-S9. D.h., die Aktivierung von CPA erfolgt bei CBA gewebsspezifischer als bei C 57 BL. -

Ein konkreter Hinweis auf die Beteiligung des Ah-Gen-Komplexes am CPA Metabolismus kommt von Dragani et al. (1981, s.o.), der eine signifikant höhere SCE-Induktion in Knochenmarkzellen nach CPA-Behandlung in Ah^d-Mäusen verglichen mit Ah^b-Mäusen im in vivo Experiment feststellte.

Einen weiteren Hinweis auf enzymatische Unterschiede zwischen den beiden hier verwendeten Stämmen erbrachten in vitro Tests mit CHO-Zellen, die eine höhere SCE-Induktion durch CPA nach Metabolisierung mit CBA-Leber-S9-Mix als nach Aktivierung mit C 57 BL-Leber-S9-Mix ergaben (Obe, pers. Mitteilung). Diese Tests wurden mit S9-Fraktionen durchgeführt, die Chargen entstammen, die im Salmonella Assay getestet wurden (III.2.1.2.). Diese Studie dient dem Vergleich der Aussagefähigkeit von Punkt- und Rekombinations- (Chromosomen/Chromatid-) Mutationstests.

Hier unternommene Versuche, den Einfluß einer in vivo Vorbehandlung mit CPA auf die Metabolisierungskapazität von S9-Fraktionen (Leber, Niere-NNR) für CPA im anschließenden Salmonella Assay zu untersuchen, kamen zu dem Resultat, daß eine Induktion von Metabolisierungsenzymen für CPA durch CPA nicht nachweisbar ist. Die Aktivität der S9-Fraktionen für die CPA-Metabolisierung nahm nach 'CPA-Induktion' signifikant ab (III.2.1.2., Abb. 15 b, Tab. 3, 4), Unterschiede zwischen CBA und C 57 BL waren nicht mehr nachweisbar. Die Ursache kann nur in der Zerstörung der metabolisierenden Enzyme durch CPA oder

Metabolite - 'Killersubstrate' - gesehen werden, worauf reine in vitro Befunde von Marinello et al. (1978) hindeuteten. Danach wird der Cytochrom P-450 Komplex durch CPA-Metabolite - vermutlich Acrolein in Reaktion mit freien SH-Gruppen der MFO-Enzyme - denaturiert. Letzteres ist daraus zu schließen, daß sich die Absorptionsbande von 450 nm zu 420 nm verschiebt, der Absorptionswellenlänge von denaturiertem Cytochrom P-450. Acrolein und 4-OH-CPA erwiesen sich dort als ähnlich wirksam in der Denaturierung von Cytochrom P-450, ebenso wie Cystein einen deutlichen Schutzeffekt bei beiden Substanzen ausübte.

Die Induktionsexperimente in der vorliegenden Arbeit wurden von mir mit 20 mg CPA/kg durchgeführt, einer Dosis, die in beiden Stämmen zu einer Mißbildungsrate von 100 % führt, wenn sie am Tag 10 oder 11 p.c. verabreicht wird (s. III.2.1.2., Abb. 15 a, b).

Die Tage 9-11 p.c. umfassen nach Spielmann et al. (1979, 1981 a) bei der Maus die sensibelste Phase während der Embryogenese gegenüber teratologischen Einflüssen von CPA. Die Tage 9-12 p.c. umfassen den Zeitraum der Organogenese. -

Höhere Dosen sind unter dem Aspekt einer Vergleichbarkeit der dosisspezifischen teratologischen Effekte in vivo mit den bei in vitro Tests an isolierten Einzelsystemen gewonnenen Ergebnissen ungeeignet. Aufgrund der geringen Konzentrationen im Gewebe ergeben sich zwar sowohl in biologischen in vitro Testverfahren als auch bei biochemischen Untersuchungen Nachweis-schwierigkeiten. Im Interesse direkter Schlußfolgerungen sind aber den biologischen Verhältnissen entsprechende Dosierungen vorzuziehen, gegenüber - meßtechnisch unkomplizierter handhabbarer - Hochdosierungen, die jenseits jeglicher Konzentrationsbereiche liegen, die sinnvoll auf biologische Verhältnisse übertragen werden können.

Messungen der Mutagenität von Leber- und Nieren(-NNR)-S9-Fractionen von Tieren, die 10min vor Organentnahme mit 20 mg CPA/kg behandelt waren, erbrachten eine leicht erhöhte Mutagenität dieser Fractionen gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Geht man von einer Gleichverteilung von CPA im

Gesamtgewebe aus, enthielt die im Test eingesetzte S9-Fraktion ca. 1-4 µg CPA und metabolisiertes CPA/Platte ($\hat{=}$ einer Konzentration von $1-5 \times 10^{-6}$ M). Dieser Konzentrationsbereich liegt an der unteren Nachweisgrenze des Salmonella Assay für diese Substanzen. Mutagene Effekte und Unterschiede irgendwelcher Art sind nicht mehr mit Sicherheit nachweisbar. Das Salmonella Assay erwies sich in diesem Fall als ungeeignet, Aufschlüsse über Unterschiede zwischen CBA und C 57 BL in der in vivo Metabolisierung von CPA zu mutagenen Produkten zu gewinnen. -

Aufgrund der o.a. Aktivitätsunterschiede zwischen Nieren-S9-Fractionen +NNR und -NNR zwischen CBA und C 57 BL bei der Metabolisierung von CPA, des bekannten Zusammenwirkens des Cytochrom P-450-Komplexes mit Monoaminoxidasen und der bekanntermaßen hohen Konzentration dieses Enzyms im Nebennierenrindenmark (primär konzentriert auf der äußeren Mitochondrienmembran), sollte daher die Beteiligung des Enzyms Monoaminoxidase (MAO; EC 1.4.3.4.) am CPA-Stoffwechsel untersucht werden.

Monoaminoxidasen greifen nur Amine mit endständigem NH_2 an, desaminieren und oxidieren zum Aldehyd. Dieses wird meist weiter zum Carboxyd oxidiert.

Im übrigen ist auch die ATP-Konzentration im Nebennierenrindenmark sehr hoch. -

Zusatz eines MAO-Hemmers zum S9-Mix bewirkte eine Reduzierung der Metabolisierung von CPA zu mutagenen Produkten im Salmonella Assay. Der Effekt war gering (max. 20 % Reduktion), aber für beide Stämme identisch (III.2.1.3., Abb. 16 a, b). Der Zusatz des Enzyms MAO (EC 1.4.3.4.) direkt zum Salmonella Testansatz zeigte deutlichere Effekte (s. III.2.1.4., Abb. 17, Tab. 5 a, b). Daraus ergibt sich der Eindruck, daß

1. das Enzym MAO am Metabolismus von CPA zu mutagenen Produkten beteiligt ist (Abb. 17, Tab. 5 a, b; Zusatz von MAO zum Salmonella Assay mit CPA ohne S9-Mix bewirkt Metabolisierung zu mutagenen Produkten deren Konzentration - der Mutationsrate nach zu urteilen - annähernd der durch Einsatz von CBA- bzw. C 57 BL-Leber-S9-Mix produzierten Menge entspricht. Dieser Effekt ist abhängig von der Enzymdosis.);

2. die MAO einen deutlichen Effekt auf die Metabolisierungskapazität der C 57 BL-Leber-S9-Fraktion ausübt (die Aktivierungskapazität sinkt bei MAO-Zusatz), während die Aktivität der CBA-S9-Fraktion von dem MAO-Zusatz fast unbeeinflusst bleibt (Abb. 17, Tab. 5 a, b).

Diese Tendenzen wurden in ergänzenden Versuchen, die den kombinierten Einsatz von MAO und MAO-Hemmer im Testansatz untersuchten, bestätigt (s. Abb. 18 a - c). Welche Reaktionen von der MAO im CPA-Metabolismus katalysiert werden, ist unbekannt. Ebenso unbekannt sind die Gründe für die stärkere Wirkung der MAO auf die Aktivierungskapazität der C 57 BL-Leber-S9-Fraktionen gegenüber dem unerheblichen Einfluß auf die CBA-Leber-S9-Fraktionen.

Aus den bisher dargestellten Daten verdichtet sich aber der Eindruck, daß genetisch determinierte enzymatische Unterschiede Ursache für die unterschiedlichen teratologischen Wirkungen in den beiden verwendeten Stämmen sind.

Nach den Untersuchungen von Frau Dr. Kocher-Becker (III.2.3.) ist für beide Stämme CBA und C 57 BL mit steigender Dosis eine signifikante Abnahme des Fetengewichts korreliert (Tab. 7). Dort besteht kein Unterschied zwischen den Stämmen. Unterschiede werden bei den übrigen teratologischen Wirkungen deutlich:

1. C 57 BL/6J reagiert empfindlicher als CBA/J auf CPA, wenn man die Gesamtmißbildungsrate betrachtet;
2. Bezogen auf Mißbildungsformen tritt bei C 57 BL Polydactylie signifikant häufiger auf als bei CBA, während Gaumenspalten bei hohen CPA-Dosen (12 und 20 mg/kg) bei CBA signifikant häufiger ausgebildet werden als bei C 57 BL (Tab. 9).

Die Zahl der Resorptionen ist bei C 57 BL generell höher als bei CBA, sie zeigt in keinem Fall eine Korrelation zur CPA-Dosis.

Die Unterschiede der Mißbildungsformen zwischen den Stämmen sind wahrscheinlich eher embryologisch zu erklären, während die Unterschiede in den Mißbildungsraten vermutlich auf die oben besprochenen enzymatischen Unterschiede zwischen den Stämmen zurückzuführen sind.

Die Embryonen beider Stämme befinden sich zum Behandlungszeitpunkt möglicherweise nicht im exakt gleichen Stadium der Embryogenese, denn beide Schädigungsformen (Polydactylie, Gaumenspalten) sind nach CPA-Behandlung typisch. Ihr Ausprägungsgrad ist abhängig vom Zeitpunkt des Einwirkens des Teratogens - hier CPA bzw. Metabolite (s. dazu Spielmann et al., 1979). Daß Verschiebungen in den Gewebskonzentrationen von CPA-Metaboliten zwischen den Stämmen CBA und C 57 BL verantwortlich für die Ausbildung unterschiedlicher teratogener Schäden sind, ist weniger wahrscheinlich.

Bei den Messungen der Konzentrationen von CPA und PAM im Blut der Muttertiere 10min nach CPA-Injektion (III.2.4.) waren keine Unterschiede zwischen den Stämmen zu registrieren. Transplacenter Übergang und Kinetikstudien konnten - wie erwähnt - wegen der gewählten geringen CPA-Konzentrationen nicht durchgeführt werden. Es hatte bei der Planung dieser Experimente das Argument überwogen, eine CPA-Konzentration einzusetzen, bei der noch differenziert auswertbare biologische Effekte auftreten und die dabei präsenten aktuellen Substanzkonzentrationen zu messen. Es wurde daher die vom biologischen Standpunkt höchste vertretbare Dosis gewählt (20 mg CPA/kg $\hat{=}$ 100 % Mißbildungen) und die unter II.8.-9. beschriebene - hier entwickelte - hochempfindliche Nachweismethode eingesetzt.

Hochdosierungen zu Meßzwecken sind, wie schon wiederholt angesprochen, unter dem Aspekt der Übertragbarkeit auf Verhältnisse und Effekte, die sich bei Normaldosierungen einstellen, problematisch und daher nach Möglichkeit zu vermeiden. Im vorliegenden Fall wäre allerdings eine Höherdosierung von CPA zur Untersuchung des transplacentaren Überganges unumgänglich. -

Die Frage nach dem/den teratogen wirksamen Metaboliten ist weiterhin unbeantwortet. Gesichert ist, daß:

1. CPA der Aktivierung bedarf, damit es überhaupt teratogen wirksam wird (s. Fantel et al., 1979 in vitro; Claussen et al., 1980 in vivo; Hales, 1982 in vivo);
2. die Aktivierung von CPA zu einem Teratogen maternal erfolgt (Claussen et al., 1980; Hales, 1982);
3. folgende Metabolite als Kandidaten für das letztendliche Teratogen favorisiert werden: 4-OH-CPA, PAM einerseits (s. Mirkes et al., 1980 in vitro; Spielmann et al., 1981 b in vitro) und 4-OH-CPA, Acrolein andererseits (Hales, 1981 a, 1982 in vivo). 4-OH-CPA spaltet bekanntlich äquimolar in PAM und Acrolein, so daß die Entscheidung nur zwischen PAM und Acrolein besteht.

Die in vivo Experimente zur Frage der embryonalen/maternalen Aktivierung von CPA benutzten die intraamniotische Injektion von CPA zur Untersuchung. Bei Applikation von CPA kam es im uni- und kontralateralen Uterushorn zu teratogenen Effekten, während 4-OH-CPA, PAM und Acrolein nur die injizierten Embryonen schädigten (Hales, 1982). Vergleichbar erwies sich CPA bei i.v. Injektion bei Kaninchen als teratogen und embryotoxisch, bei intraamniotischer Injektion aber als wirkungslos (Claussen et al., 1980). Obwohl schon früheste Stadien des Embryos bei der Maus Stoffwechselaktivitäten für chemische Karzinogene aufweisen und auch die Ah-Locus Funktionen schon induzierbar sind (s. Filler, Lew, 1981; Galloway et al., 1980; Nebert et al., 1979), scheinen diese Aktivitäten nach den obigen Ergebnissen keinen bedeutenden Einfluß auf die Metabolisierung von CPA zu haben.

Abschließend ist zu den von mir durchgeführten Experimenten mit den Mäusestämmen CBA/J Kch und C 57 BL/6J Kch zusammenzufassen:

1. Beide Stämme unterscheiden sich in der enzymatischen Aktivierung von CPA zu mutagenen Produkten (Salmonella Assay, CHO-Zell-Assay). (Beide Stämme sind Ah-Locus 'responsive', weisen aber genetisch determinierte physiologische Unterschiede auf (s.o.)) Ursache für die Unterschiede in

der CPA-Aktivierung zwischen den Stämmen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine unterschiedliche enzymatische Grundausstattung der Stämme.

- 1a. Die Beteiligung einer Monoaminoxidase an der Aktivierung von CPA ist wahrscheinlich.
- 1b. Die Nieren inklusive Nebennieren stellen ein weiteres wichtiges Metabolisierungsorgan für CPA dar, dessen Aktivität der Leber nahekommt. Deutlich erkennbar ist dieses hohe Potential der Nebenniere zur Aktivierung von CPA zu mutagenen Produkten beim Stamm CBA/J, der gegenüber den teratogenen Wirkungen von CPA resistenter als C 57 BL/6J reagiert. Bei C 57 BL/6J ist eine besondere Metabolisierungskapazität der Nebenniere dagegen nicht feststellbar.
- 1c. Funktionen des Ah-Locus sind an der CPA-Aktivierung beteiligt (Ah^b-Stämme reagieren resistenter gegenüber CPA als Ah^d-Stämme).

2. Beide Stämme unterscheiden sich

- a) in ihrer Sensibilität gegenüber der teratogenen Wirkung von CPA
- b) in der Art des maximal ausgebildeten Schädigungstyps.

Ursachen sind im Fall a) sehr wahrscheinlich Unterschiede in der Art der Metabolisierung (Balance Aktivierung/Deaktivierung) oder der Metabolisierungskapazität. (Unterschiede im transplacentaren Übergang können nicht vollständig ausgeschlossen werden). Für den Punkt b) sind Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Embryogenese anzunehmen.

3. Das Salmonella Assay erwies sich auch hier in seiner Standardversion als geeignet, im Zusammenwirken mit anderen Methoden einen wesentlichen Beitrag zur Auffindung und Charakterisierung von aktiven Enzymen in einem speziellen Stoffwechselweg zu liefern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, den bzw. die wirksamen Metaboliten von Cyclophosphamid (CPA) zu charakterisieren, welche(r) die mutagenen und teratogenen Eigenschaften dieser Substanz vermittelt. Das zu diesem Zweck entwickelte und eingesetzte System erwies sich als sehr effektiv. Es basiert im wesentlichen auf dem Vergleich von CPA, Metaboliten und deuterierten Derivaten von CPA in Standardtestverfahren (Ames-, Lymphocyten - Assay; Teratogenitäts- und Pharmakokinetikstudien).

Es konnte gezeigt werden, daß der Einsatz deuterierte Derivate in biologischen in vitro Standardtests ohne Einschränkung möglich ist und im Falle von CPA zu schnell verfügbaren und aussagekräftigen Resultaten führt, die die in vivo erhaltenen Ergebnisse sinnvoll ergänzen und unterstützen. Die hier angegebene Methode zur simultanen Bestimmung von PAM und CPA aus einer Probe im GC - MS - Verfahren stellt m.E. zur Zeit das günstigste Verfahren zum Nachweis dieser Substanzen bei der angegebenen Fragestellung dar.

Die für CPA gewonnenen Resultate lassen sich kurz wie folgt zusammenfassen:

Gemessen bzw. untersucht wurden:

a)

für CPA/deuterierte Derivate/Hauptmetaboliten von CPA:

- Mutagenität	<u>in vitro</u>	}	an Bakterien
- Pharmakokinetik	<u>in vivo</u>		
- transplac. Übergang	<u>in vivo</u>	}	an der Maus
- Induktion enzymat.	<u>in vivo</u>		
Metabolisierungssyst.	<u>in vitro</u>	}	an Bakterien
- Beteiligung spez. Enzyme			
an der Aktivierung von CPA	<u>in vitro</u>		

b)

zusätzlich von beteiligten Arbeitsgruppen (soweit Resultate in dieser Dissertation berücksichtigt sind):

- Mutagenität (AG Prof. Dr. Obe)	<u>in vitro</u>	}	an CHO-, Lymphocyten Zellen
- Pharmakokinetik, transplac. Übergang (AG Prof. Dr. Nau)	<u>in vivo</u>		
- Teratologie (AG Prof. Dr. Kocher, AG Dr. Spielmann)	<u>in vivo</u>	}	an der Maus

Ergebnisse zu a):

(Die Resultate zu den unter b) aufgeführten Untersuchungen sind ausführlich in der Diskussion berücksichtigt und dienen zur Absicherung und Ergänzung der hier dargestellten Ergebnisse)

Nach den gewonnenen Ergebnissen werden CPA sowie alle seine Hauptmetaboliten vorwiegend durch Phenobarbital - induzierbare Enzymsysteme (u.a. Cytochrom P-450 mischfunktionelle Oxidasen) zu - stärker - mutagenen Produkten metabolisiert. CPA selbst ist im geprüften Dosisbereich ohne enzymatische Aktivierung nicht mutagen. - Das Enzym Monoaminoxidase scheint bei der Vermittlung der mutagenen Eigenschaften von CPA eine nicht unwesentliche Rolle zu spielen. - CPA selbst besitzt keine Induktionseigenschaften für metabolisierende Enzyme. Nach Vorbehandlung von Testtieren mit CPA sinkt deren metabolische Fähigkeit zur Aktivierung von CPA im in vitro Mutagenitätstest. Es gibt deutliche Hinweise, daß CPA selbst oder Metaboliten (4-OH-CPA, Acrolein) als Killersubstrate wirken.

Die Hauptorgane für die CPA - Metabolisierung sind Leber und Nieren, wobei die Nebenniere einen hohen Anteil an der Aktivierung von CPA zu mutagenen Produkten hat.

Sowohl bei in vitro als auch bei in vivo Testung von deuterierten Derivaten

von CPA erwies sich nur 5'5-d₂-CPA als geringer wirksam als CPA. Isotop-effekte zwischen 1.7 und 12.3 wurden bei Mutagenitäts-, Teratogenitäts- und Pharmakokinetikstudien ermittelt. Die Abnahme der PAM - Produktion aus 5'5-d₂-CPA ist eindeutig mit der Verminderung der biologischen Effekte gekoppelt. Demnach ist die β - Eliminierungsreaktion von Acrolein der entscheidende und geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Aktivierung von CPA.

Die Testung der Mutagenität von CPA und seinen Hauptmetaboliten ergab, daß alle Metaboliten durch in vitro Metabolisierung mit S9-Fraktion zu höherem mutagenen Potential aktiviert wurden. PAM, Nor-HN2 und 4-OH-CPA erwiesen sich in allen Mutagenitätstests mit und ohne enzymatische Aktivierung als hoch mutagen - 4-OH-CPA ohne Aktivierung zudem als hoch cytotoxisch -, während 4-keto-CPA das mit Abstand schwächste Mutagen darstellt. Carboxy-PA nimmt eine Mittel- und Sonderstellung ein, vermutlich aufgrund der Möglichkeit, enzymatisch in PAM und Hydacrylsäure umgesetzt werden zu können.

Die mutagenen Eigenschaften von CPA sind demnach nicht einem der untersuchten Metaboliten direkt zuzuschreiben, sondern einem Folgeprodukt (entweder Folgemetaboliten oder enzymatisch aktivierten Metaboliten). Der Hinweis, daß die Alkylierung von PAM und Nor-HN2 bei physiologischen pH über Aziridinium - Ionen - Zwischenprodukte abläuft, spricht für eine enzymatisch begünstigte Ausbildung dieser Konformation bei PAM und Nor-HN2.

Die untersuchten Mäusestämme CBA/J Kch und C 57 BL/6J Kch, die unterschiedliche teratogenen Reaktionen gegenüber CPA aufweisen (CBA/J Kch: resistent, Ah-Locus: induzierbar; C 57 BL/6J Kch: sensibel, Ah-Locus: induzierbar), besitzen in der Leber und besonders deutlich in der Niere und Nebenniere unterschiedliche Metabolisierungskapazitäten für CPA zu mutagenen Produkten (höhere Kapazität bei Stamm CBA/J). Unterschiede im transplacentaren Übergang konnten mit dem verwendeten Meßverfahren nicht nachgewiesen werden. - Die Diskrepanz zwischen höherer Metabolisierungsaktivität zu mutagenen Produkten bei gleichzeitig geringerer teratogener Reaktion bei CBA/J Kch im Vergleich zu C 57 BL/6J Kch konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Da die Aktivierung von CPA zu teratogenen Metaboliten maternal erfolgt, ist

anzunehmen, daß die unterschiedliche teratogene Reaktion der Stämme auf diese genetisch bedingten Unterschiede im Enzymsatz der Muttertiere zurückzuführen ist.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten:

Ziel der Untersuchungen war die Charakterisierung des/der biologisch wirksamen Metaboliten von CPA und der entscheidenden Reaktion(en) in der Aktivierung von CPA zum wirksamen Metaboliten (Toxifizierung). Die Experimente ergaben, daß die β -Eliminierungsreaktion von Acrolein aus Aldo-PA den entscheidenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der CPA Aktivierung zu mutagenen und teratogenen Produkten darstellt. Diese Reaktion erfolgt spontan, kann aber zusätzlich zu einem geringen Grad enzymatisch katalysiert werden. Die mutagenen und teratogenen Wirkungen von CPA beruhen nach Experimenten an zwei genetisch verschiedenen Mäusestämmen (CBA/J Kch und C 57 BL/6J Kch) auf unterschiedlichen (enzymatisch katalysierten) Mechanismen bzw. sie sind verschiedenen Metaboliten zuzuschreiben. Hauptkandidaten für die biologischen Wirkungen von CPA sind PAM, Nor-HN2 (Mutagenität) und Acrolein (Teratogenität). Die biologischen Effekte von toxifiziertem CPA sind sehr wahrscheinlich nicht ausschließlich auf spontane Mechanismen zurückzuführen, da zumindest die Mutagenität sämtlicher Metaboliten durch Enzymzusatz gesteigert wird. Die Aktivierung von CPA zu mutagenen Produkten kann neben dem bekannten Weg über das Cytochrom P-450 System auch von einer Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4.) katalysiert werden.

Für die simultane Bestimmung von PAM und CPA aus Plasma und Gewebe im GC - MS - Verfahren wurde eine bisher nicht veröffentlichte Methode entwickelt.

VI. L I T E R A T U R

- Alarcon, R.A., J.Meienhofer, E.Atherton (1972): Isophosphamide as a new acrolein-producing antineoplastic isomer of cyclophosphamide. Cancer Res. 32, 2519 - 2523
- Alvares, A.P., A.Kappas (1977): The inducing properties of polychlorinated biphenyls on hepatic monooxygenases. Clin.Pharmacol.Therap. 22, No.5,11, 809 - 816
- Ames, B.N., W.E.Durston, E.Yamasaki, F.D.Lee (1973): Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, No.8, 2281 - 2285
- Ames, B.N., F.D.Lee, W.E.Durston (1973): An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 79, No.3, 782 - 786
- Arni, P., A.Lüth, E.Deparade, D.Müller (1980): Studies of the metabolizing effect of the S9 liver fraction, hepatic microsomes and microsomal supernatant in the Ames test. Mut.Res. 74 (2), 154
- Balbinder, E., C.I.Reich, D.Shugarts, J.Keogh, R.Fibiger, T.Jones, A.Banks (1981): Relative mutagenicity of some urinary metabolites of the anti-tumor drug cyclophosphamide. Cancer Res. 41 (VII), 2967 - 2972
- Benedict, W.F., M.S.Baker, L.Haroun, E.Choi, B.N.Ames (1977): Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella/microsome test. Cancer Res. 37 (VII), 2209 - 2213
- Benedict, W.F., A.Banerjee, N.Venkatesan (1978): Cyclophosphamide-induced oncogenic transformation, chromosomal breakage, and SCE following microsomal activation. Cancer Res. 38 (IX), 2922 - 2924

- Brock, N. (1976): Comparative pharmacologic study in vitro and in vivo with CPA (NSC - 26271), CPA-metabolites and plain nitrogen mustard compounds. Cancer Treat. Rep. 60, No. 4, 301 - 308
- Brock, N., H.-J. Hohorst (1977): The problem of specificity and selectivity of alkylating cytostatics: Studies on N-2-chloroethylamido-oxazaphosphorines. Z. Krebsforsch. 88, 185 - 215
- Brock, N., J. Stekar, J. Pohl, U. Niemeyer, G. Scheffler (1979): Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of CPA, Ifosfamide, Trofosfamide and Sufosfamide. Arzneim. Forsch./Drug Res. 29 (1), 659 - 661
- Bulfield, G. (1981): Inborn errors of metabolism in the mouse. in "Biology of the house mouse" ed. R. J. Berry, Academic Press, N.Y., 643-665
- Callen, D.F., R.M. Philpot (1977): Cytochrome p-450 and the activity of promutagens in Sacch. cerev.. Mut. Res. 45, 309 - 324
- Claussen, U., H.-G. Kregel, H.J. Schrörs (1980): The embryotoxic effects of CPA in rabbits tested in vivo by i.v. injection and by the yolk-sac method. Drug Res. 30 (11), No. 9, 1585 - 1588
- Colvin, M., R.B. Brundrett, M.-N. N. Kan, J. Jardine, C. Fenselau (1976): Alkylating properties of phosphoramidate mustard. Cancer Res. 36 (111), 1121 - 1126
- Conney, A.H. (1967): Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol. Rev. 19, 3, 317 - 366
- Connors, T.A., P.J. Cox, P.B. Farmer, A.B. Foster, M. Jarman, J.K. Macleod (1974): Observations on the mechanism of hydroxylation of CPA by rat liver microsomes: The metabolism of CPA-4-d₂. Biomed. Mass. Spectr. 1, 130 - 136
- Cox, P.J. (1979): Cyclophosphamide cystitis: Identification of acrolein as the causative agent. Biochem. Pharmacol. 28, 2045 - 2049

- Cox, P.J., P.B.Farmer, A.B.Foster, E.D.Gilby, M.Jarman (1976a): The use of deuterated analogs in qualitative and quantitative investigations of the metabolism of CPA (NSC - 26271). *Cancer Treat.Rep.* 60, 483 - 491
- Cox, P.J., L.Levin (1975): Novel metabolic products of cyclophosphamide in human urine. *Biochem.Pharmacol.* 24, 1233 - 1235
- Cox, P.J., B.J.Phillips, P.Thomas (1976b): Studies on the selective action of CPA (NSC -26271): Inactivation of the hydroxylated metabolite by tissue-soluble enzymes. *Cancer Treat.Rep.* 60, 321 - 326
- Cox, P.J., B.J.Phillips, P.Thomas (1975c): The enzymatic basis of the selective action of CPA. *Cancer Res.* 35, 3755 - 3761
- de Raat, W.K. (1977): The induction of SCE,s by CPA in the presence of differently induced microsomal fractions of rat liver. *Chem.-Biol.Interactions* 19, 125 - 131
- Domeyer, B.E., N.E.Sladek (1980): Metabolism of 4-OH-CPA/Aldo-PA in vitro. *Biochem.Pharmacol.* 29, 2903 - 2912
- Dragani, F.A., A.Zunino, G.Sozzi (1981): Differences in SCE-induction in vivo by CPA in murine strains. *Carcinogenesis* 2, No.3, 219 - 222
- Ellenberger, J., G.R.Mohn (1977): Mutagenic activity of major mammalian metabolites of CPA toward several genes of E.Coli. *J.Toxicol.Environ. Health* 3, 637 - 650
- Fantel, A.G., J.C.Greenaway, M.R.Juchau, T.H.Shepard (1979): Teratogenic bioactivation of CPA in vitro. *Life Sciences* 25, 67 - 72
- Fenselau, C. (1976): Review of the metabolism and mode of action of CPA. *J.of the AOAC* 59, No.5, 1028 - 1036

- Fenselau, C., M.-N.N.Kan, S.Billels, M.Colvin (1975): Identification of phosphordiamidic acid mustard as a human metabolite of CPA. *Cancer Res.* 35, 1453 - 1457
- Filler, R., K.J.Lew (1981): Developmental onset of mixed-function oxydase activity in preimplantation mouse embryos. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 78, No.11, 6991 - 6995
- Fleer, R., M.Brendel (1982): Toxicity, interstrand x-links and DNA-fragmentation induced by activated CPA in yeast: Comparative studies on 4-OOH-CPA, its monofunctional analogon acrolein, PAM, and Nor-HN2. *Chem.Biol.Interactions* 39, 1 - 15
- Friedrich, U., H.U.Aeschbacher, J.P.Seiler, F.E.Würgler (1982): The Salmonella/microsome assay: Some possible causes for interlaboratory variations. *Mut.Res.* 103, 133 - 140
- Galloway, S.M., P.E.Perry, J.Meneses, D.W.Nebert, R.A.Pedersen (1980): Cultured mouse embryos metabolize benzo(a)pyren during early gestation: Genetic differences detectable by SCE. *Pro.Nat.Acad.Sci. USA* 77, No.6, 3524 - 3528
- Gatehouse, D. (1978): Detection of mutagenic derivatives of CPA and a variety of other mutagens in a 'microtitre'^R fluctuation test without microsomal activation. *Mut.Res.* 53, 289 - 296
- Graf, U. (1976/7): Chemische Mutagenese. *Archiv für Genetik*, 49/50, 1-15
- Green, M.C., ed. (1981): Genetik variants and strains of the laboratory mouse. G.Fischer Verlag, Stuttgart
- Hales, B.F. (1981a): Comparision of the teratogenicity and mutagenicity of some metabolites and structural analogs of CPA. *Teratology* 23, 40A
- Hales, B.F. (1981b): Modification of the teratogenicity and mutagenicity of CPA with thiol compounds. *Teratology* 23, 373 - 381

- Hales, B.F. (1982): Comparision of the mutagenicity and teratogenicity of CPA and its active metabolites, 4-OH-CPA, PAM, and acrolein. *Cancer Res.* 42, 3016 - 3021
- Hales, B.F., R.Jain (1980a): Characteristics of the activation of CPA to a mutagen by rat liver. *Biochem.Pharmacol.* 29, 256 - 259
- Hales, B.F., R.Jain (1980b): Effects of phenobarbital and B-naphthoflavone on the activation of CPA to mutagenic metabolites in vitro by liver and kidney from male and female rats. *Biochem.Pharmacol.* 29, 2031 - 2037
- Hohorst, H.-J., U.Draeger, G.Peter, G.Voelcker (1976): The problem of oncostatic specifity of CPA (NSC - 26271): Studies on reactions that control the alkylating and cytotoxic activities. *Cancer Treat.Rep.* 60, No.4, 309 - 315
- Jardine, J., C.Fenselau, M.Appler, M.-N.N.Kan, R.B.Brundrett, M.Colvin (1978): Quantitation by GC-chemical ionisation MS of CPA, PAM, and Nor-HN2 in the plasma and urine of patients recieving CPA-therapy. *Cancer Res.* 38, 408 - 415
- Jardine, J., R.Brundrett, M.Colvin, C.Fenselau (1976): Approaches to the pharmacokinetics of CPA (NSC - 26271): Quantitation of metabolites. *Cancer Treat.Rep.* 60, 403 - 408
- Kouri, R.E., L.M.Schechtman, D.W.Nebert (1980): Metabolism of chemical carcinogens. In "Genetic differences in chemical carcinogenesis" ed. R.E.Kouri, CRC Press, Boca Raton, Fla, 21 - 66
- Lenssen, U., H.-J.Hohorst (1979): Zur Frage der Permeabilität von N,N-Bis(2-chloroäthyl)phosphorsäurediamid in Tumorzellen. *J.Cancer Res. Clin.Oncol.* 93, 161 - 164

- Lijinsky, W., A.W.Andrews (1980): Mutagenicity of vinyl compounds in *Salmonella typh.* *Terat.,Carcinog.,and Mutagenesis* 1, 259 - 267
- Low, J.E., R.F.Borch, N.E.Sladek (1982): Conversion of 4-OH-peroxy-CPA and 4-OH-CPA to PAM and acrolein mediated by bifunctional catalysts. *Cancer Res.* 42, 830 - 837
- Lush, I.E. (1981): Mouse pharmacogenetics. in "Biology of the house mouse" ed. R.J.Berry, Academic Press, N.Y., 517 - 546
- Marinello, A.J., H.L.Gurtoo, R.F.Struck, B.Paul (1978): Denaturation of cytochrome p-450 by CPA metabolites. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 83, 1347 - 1353
- Mayer, V.W., C.J.Hybner, D.J.Brusick (1976): Genetic effects induced in *Sacch.cerev.* by CPA in vitro without liver enzyme preparations. *Mut. Res.* 37, 201 - 212
- McCann, J., N.E.Spingarn, J.Kobori, B.N.Ames (1975): Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R-factor plasmids. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 72, No.3, 979 - 983
- Mirkes, P.E., A.G.Fantel, J.C.Greenaway, T.H.Shepard (1981): Teratogenicity of CPA metabolites: PAM, acrolein, and 4-keto-CPA in rat embryos cultured in vitro. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 58,
- Mohn, G.R., J.Ellenberger (1976): Genetic effects of cyclophosphamide, ifosfamide, and trophosfamide. *Mut.Res.* 32, 331 - 360
- Nau, H., H.Spielmann, C.M.LoTurco Mortler, K.Winckler, L.Riedel, G.Obe (1982): Mutagenic, teratogenic and pharmacokinetic properties of CPA and some of its deuterated derivatives. *Mut.Res.* 95, 105 - 118
- Nebert, D.W., S.A.Atlas, T.M.Guenther, R.E.Kouri (1978): The Ah-locus: Genetic regulation of the enzymes which metabolize polycyclic hydrocarbons and the risk for cancer. in "Polycyclic hydrocarbons and Can-

- cer, Vol.2nd eds. H.Gelboin, P.O.P.Ts'o, Academic Press, N.Y., 345-390
- Nebert, D.W., Shu Shum, A.R.Boobis, S.A.Atlas (1979): Developmental pharmacology and the Ah-locus: Regulatory and temporal genes affecting teratogenesis. *Acta biol.med.germ.* 38,4 , 519 - 529
- Netter, K.J. (1980): Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes. *Pharmacol.Ther.* 10, 515 - 535
- Pak, K., T.Iwasaki, M.Miyakawa, O.Yoshida (1979): The mutagenic activity of anti-cancer drugs and the urine of rats given these drugs. *Urological Res.* 7, 119 - 124
- Parkinson, A., R.Cockerline, S.Safe (1980): Polychlorinated biphenyl isomers and congeners as inducers of both 3-methylcholanthrene- and phenobarbitone-type microsomal enzyme activity. *Chem.Biol.Interactions* 29, 277 - 289
- Patel, J.M., J.C.Wood, K.C.Leibman (1980): The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metab. and Dispos.* 8,5 , 305 - 308
- Peak, M.J., S.S.Dornfeld, D.Venters (1982): Liver-microsome S9 enzyme increases spontaneous background mutation frequency in the Ames Salmonella test system in the absence of any added mutagen. *Mut.Res.* 103, 263 - 265
- Peters, J. (1981): Enzyme and protein polymorphism. in "Biology of the house mouse" ed. R.J.Berry, Academic Press, N.Y., 479 - 516
- Powers, J.F., N.E.Sladek (1983): Cytotoxic activity relative to 4-OH-CPA and PAM concentrations in the plasma of CPA treated rats. *Cancer Res.* 43, 1101 - 1106
- Ryan, D.E., P.E.Thomas, W.Levin (1977): Properties of purified liver microsomal cytochrome p-450 from rats treated with the polychlorinated

- biphenyl mixture aroclor 1254. *Molec.Pharmacol.* 13, 521 - 532
- Snyder, R., H.Remmer (1979): Classes of hepatic microsomal mixed function oxidase inducers. *Pharmacol.Ther.* 7, 203 - 244
- Spielmann, H., H.-G.Eibs, U.Jacob-Müller (1979): CPA-treatment prior to implantation: The effects on embryonic development. in "Adv.in the studies of birth defects; Teratological testing" ed. T.V.N.Persaud, MTP Press Ltd, Lanc.Engl., 95 - 112
- Spielmann,H., U.Jacob-Müller, H.-G.Eibs, W.Beckord (1981a):Investigations on CPA treatment during the preimplantation period. I.Differential sensitivity to maternal CPA Treatment. *Teratology* 23, 1 - 5
- Spielmann, H., U.Jacob-Müller (1981b):Investigations on CPA treatment during the preimplantation period. II.In vitro studies on the effects of CPA and its metabolites 4-OH-CPA, PAM, and acrolein on blastulation of 4-cell and 8-cell mouse embryos and on their subsequent development during implantation. *Teratology* 23, 7 - 13
- Struck, R.F., M.C.Kirk, L.B.Mellett, S.Eldareer, D.L.Hill (1971): Urinary metabolites of the antitumor agent cyclophosphamide. *Molec.Pharmacol.* 7, 519 - 529
- Struck, R.F., M.C.Kirk, M.H.Witt, W.R.Laster jr. (1975): Isolation and mass spectral identification of blood metabolites of CPA: Evidence forPAM as the biologically active metabolite. *Biomed.MassSpectr.* 2, 46 - 52
- Suling, W.J., R.F.Struck, C.W.Woolley, W.M.Shannon (1978): Comparative disposition of PAM and other CPA metabolites in the mouse using the Salmonella/mutagenicity assay. *Cancer Treat.Rep.* 62, 1321 - 1328
- Thomas, A.F. (1972): Deuterium labelling in organic chemistry. ed. Appleton - Century - Crofts Educ.Div., Meredith Corp., N.Y.

- Waalkens, D.H., H.F.P.Joosten, R.D.F.M.Taalman, J.M.J.C.Scheres, T.D.Yih, A.Hoekstra (1981): SCE's induced in vitro by CPA without exogenous metabolic activation in lymphocytes from three mammalian species. Toxicol.Letters 7, 229 - 232
- Wagner,T., D.Heydrich, H.Bartels, H.-J.Hohorst (1980): Einfluß von Leberparenchymschäden, Niereninsuffizienz und Hämodialyse auf die Pharmakokinetik von CPA und seinen aktivierten Metaboliten. Arzneim.Forsch. /Drug Res. 30(11), 1589 - 1592
- Wagner, T., G.Peter, G.Voelcker, H.-J.Hohorst (1977): Characterisation and quantitative estimation of activated CPA in blood and urine. Cancer Res. 37,8 , 2592 - 2596

ADDENDUM

- Brockhaus ABC Chemie (1971), VEB F.A.Brockhaus Verlag, Leipzig, 280, 354 - 355, 567 - 568, 578, 1095 - 1097
- Lo Turco Mortler,C.M. (1980): Ausarbeitung gaschromatografischer und GC-MS Methoden zur vergleichenden Bestimmung der transplacentaren Pharmakokinetik von Cyclophosphamid und deuterierter Analoge in der Maus. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin

LEBENS LAUF

- 9.10.1954 geboren als Sohn des Architekten Horst Winckler und seiner Frau Ingrid geb. Walski in Berlin - Neukölln
- 1960 - 1970 Besuch von Grundschulen (Gustav - Schwab - und 21.Grundschule) und Gymnasium (Albert - Schweitzer - Gymnasium) in Berlin - Neukölln
- 1970 - 1973 Besuch des Gymnasiums im Schulzentrum Kreuzheide nach Umzug in Wolfsburg
- Mai 1973 Abitur mit Auszeichnung (großes Latinum)
- WS 1973/74 Immatrikulation am Fachbereich Biologie der FU - Berlin
- Mai 1976 Vordiplom in Biologie
- Nov. 1977 Diplomhauptprüfung
- Juni 1978 Beginn der Diplomarbeit mit dem Titel "Einfluß von Zellzyklus und Reparatursystemen auf die UV - induzierbare Mutabilität und Letalität bei *Saccharomyces cerevisiae*" am Institut für Biophysik unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.W.Laskowski
- Juni 1979 Diplom in Biologie
- 1979 - 1983 Forschungsstudium mit mikrobiologisch/strahlenbiologischer Thematik am Institut für Biophysik (Prof.Dr.W.Laskowski, Dr.A.Yasui; Fachbereich 23, Biologie) und Assistentenstelle im SFB 29 der DFG (Embryonalpharmakologie und Toxikologie; Aufgabengebiet: Mutagenitätstestung) am Institut für Humangenetik (Prof.Dr.K.Sperling) und am Institut für Embryonalpharmakologie und Toxikologie (Prof.Dr.H.Nau; beide Institute Fachbereich 03, Medizin, Klinikum Charlottenburg)

Feb. 1981 Beginn der Arbeiten an der Dissertation unter Leitung von
Herrn Prof.Dr.H.Nau am Institut für Embryonalpharmakologie
und Toxikologie der FU - Berlin sowie am Institut für Bio-
physik der FU - Berlin

Apr. 1983 - Assistent am Institut für Biophysik der FU - Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1981 bis Dezember 1982 am Institut für Embryonalpharmakologie und Toxikologie sowie am Institut für Biophysik durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr. H. Nau für die Überlassung, Betreuung und anregenden Diskussionen des Themas, sowie seine großzügige Unterstützung der Arbeiten.

Ebenso sei Herrn Prof.Dr. W. Laskowski für sein Interesse und Ermöglichung der Arbeiten an seinem Institut gedankt.

Bei allen beteiligten Arbeitsgruppen, Kollegen und Kommilitonen bedanke ich mich nicht minder herzlich für ihre geduldige, unermüdliche und sehr angenehme Zusammenarbeit. Besonders erwähnen möchte ich hier die Arbeitsgruppen Prof.Dr.H.Nau, Prof.Dr.W.Kocher, Prof.Dr.W.Laskowski, Prof.Dr.G.Obe und Dr.H.Spielmann, sowie Frau U.Schwikowski und Frau H.Weber, die mit Fotos und Schreibmaschine zur endgültigen Fertigstellung der Arbeit beitrugen.

